

TRAITÉ DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 18 avril 2001 (18.04.01)	
Demande internationale no PCT/FR00/01791	Référence du dossier du déposant ou du mandataire 341022/18290
Date du dépôt international (jour/mois/année) 27 juin 2000 (27.06.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 28 juin 1999 (28.06.99)
Déposant RONSIN, Christophe etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

23 janvier 2001 (23.01.01)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI
 34, chemin des Colombettes
 1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

R. Forax

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITÉ DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
20 rue de Chazelles
F-75847 Paris Cedex 17
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 15 mars 2001 (15.03.01)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire 341022/18290	
Demande internationale no PCT/FR00/01791	Date du dépôt international (jour/mois/année) 27 juin 2000 (27.06.00)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

☐ le déposant ☐ l'inventeur ☒ le mandataire ☐ le représentant commun

Nom et adresse MARTIN, Jean-Jacques Cabinet Regimbeau 26, avenue Kléber F-75116 Paris FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	no de téléphone 01 45 00 92 02	
	no de télécopieur 01 45 00 46 12	
	no de téléimprimeur	

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

☐ la personne ☐ le nom ☒ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile

Nom et adresse MARTIN, Jean-Jacques Cabinet Regimbeau 20 rue de Chazelles F-75847 Paris Cedex 17 FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	no de téléphone 01 44 29 35 00	
	no de télécopieur 01 44 29 35 99	
	no de téléimprimeur	

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

☒ à l'office récepteur ☒ aux offices désignés concernés
☐ à l'administration chargée de la recherche internationale ☐ aux offices élus concernés
☐ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international ☐ autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé: Ellen Moyse no de téléphone (41-22) 338.83.38
---	---

11/1/2011

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

10/019,219-6
RECEIVED

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

SEP 30 2002

(PCT Article 36 and Rule 70)

TECH CENTER 1600/2900

Applicant's or agent's file reference 341022/18290	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/01791	International filing date (day/month/year) 27 June 2000 (27.06.00)	Priority date (day/month/year) 28 June 1999 (28.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 7/06		
Applicant INSTITUT GUSTAVE ROUSSY		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 1 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 23 January 2001 (23.01.01)	Date of completion of this report 20 September 2001 (20.09.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

CONCLUSIONS

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

☒ the international application as originally filed.

☐ the description. pages 1-32 . as originally filed.

pages _____ . filed with the demand.

pages _____ . filed with the letter of _____ .

pages _____ . filed with the letter of _____ .

☐ the claims. Nos. 1-5.13-36 . as originally filed.

Nos. _____ . as amended under Article 19.

Nos. _____ . filed with the demand.

Nos. 6-12 . filed with the letter of 10 August 2001 (10.08.2001) .

Nos. _____ . filed with the letter of _____ .

☐ the drawings. sheets/fig 1/10-10/10 . as originally filed.

sheets/fig _____ . filed with the demand.

sheets/fig _____ . filed with the letter of _____ .

sheets/fig _____ . filed with the letter of _____ .

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description. pages _____

☐ the claims. Nos. _____

☐ the drawings. sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

T/FR 00/01791

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-8, 11-31	YES
	Claims	9-10, 32-36	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-8, 17, 24-30	YES
	Claims	9-16, 18-23, 31-36	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-36	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The following documents are referred to:

- D1: DATABASE GENEMBL [on-line] 28 April 1997 (1997-04-28) SCHWER ET AL.: "H. sapiens mRNA for putative carboxylesterase", XP002135540, cited in the application; and SCHWER ET AL.: "Molecular cloning and characterization of a novel putative carboxylesterase, present in human intestine and liver", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol. 233, N° 1, 1997, pages 117-120, XP000891817
- D2: DATABASE GENEMBL [on-line] 25 November 1997 (1997-11-25) SONE T.: "Homo sapiens mRNA for carboxylesterase, complete cds", XP002135542
- D3: WO-A-97/29183 (US HEALTH; HWU PATRICK (US); REEVES MARK (US); ROSENBERG STEVEN A) 14 August 1997 (1997-08-14).

- The wording of the claims concerning DNA fragments is such that the subject matter of these claims includes the sequence coding for human intestinal carboxylesterase. Consequently, documents D1 and D2 deprive Claims 9 and 10 of novelty (PCT Article 33(2)).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2. The peptide compounds of Claims 1-3, 5, 7 and 8 include sequences which are not defined. They may therefore include any epitope known from prior art. Thus, all antibodies known from prior art deprive Claim 32 of novelty (PCT Article 33(2)). Consequently, the subject matter of Claims 33-36 is likewise not considered to be novel (PCT Article 33(2)).
Furthermore, the method for producing an antibody defined in Claim 31 does not appear to involve an inventive step (PCT Article 33(3)).
3. Claims 11-16 and 18-23 (in so far as they refer to the DNA fragments of Claims 9 and 10 which are not considered to be novel) are readily inferable from the subject matter of Claims 9 and 10, in the light of the general knowledge of a person skilled in the art, or, for the claims referring to dendritic cells, in the light of D3. Consequently, the subject matter of Claims 11-16 and 18-23 is considered to involve no inventive step (PCT Article 33(3)).
4. The polypeptide with the sequence SEQ ID N° 1 is novel and its identification is not suggested by the prior art cited in the international search report. This polypeptide is considered to involve an inventive step because of the presence of at least one sequence - SPRWWPTCL - causing a T specific response which can be used for treating certain carcinomas. Furthermore, no sequence comprising either a sequence of at least eight consecutive amino acids of the sequence SEQ ID N° 1, or a sequence 80% identical to the sequence SPRWWPTCL, or a sequence 80% identical to a sequence of 9 to 10 consecutive amino acids of the sequence SEQ ID N° 1, has been identified in the international search report. Consequently, Claims 1-8 and the claims referring

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/01791

exclusively to the compounds of Claims 1-8 (Claims 17 and 24-30) satisfy the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

5. There is a problem of clarity concerning the relationship of dependency between Claims 1 and 2. It is not clear whether the compound of Claim 2 must include at least 8 consecutive amino acids of the sequence SEQ ID N° 1 **and** a sequence 80% identical to the sequence SPRWWPTCL, or whether the second of these features is substituted for the first. In the latter case, the subject matter of Claim 2 includes compounds which are not included in Claim 1, and Claim 2 can therefore not be dependent on Claim 1.
6. A product may be defined in terms of its production process if there is no other way to define the product clearly. This does not apply to the compounds of Claims 5, 7 and 8, which should therefore be defined in terms of their technical features.
7. Furthermore, in the present case, it would appear to be preferable to limit the number of independent claims concerning a peptide compound to a single independent claim.
It should be noted that a problem of unity is liable to arise if there is no novel and inventive concept common to all the claims concerning a peptide compound (Claims 1-3, 5, 7 and 8).
8. The peptide compounds of Claims 1, 3 and 5 do not meet the requirements of PCT Article 5. A person skilled in the art could not deduce from the teaching of the present application which peptide compounds derived from the sequence SEQ ID N° 1 are capable of causing a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VIII. Certain observations on the international application

T specific response, without having to carry out extensive and uncertain experimentation. Indeed, there is no indication suggesting that a said peptide compound other than SPRWWPTCL can cause a T specific response. This objection applies *a fortiori* to Claims 7 and 8, which concern peptide compounds derived from the peptide compounds of Claims 1, 3 and 5 by introducing an undefined mutation or alteration in order to increase the immunogenicity of the peptide compounds of Claims 1, 3 and 5. At present, only peptide compounds containing a sequence which is at least 80% identical to the sequence SPRWWPTCL appear to meet the requirements of PCT Article 5.

9. The method of Claim 4 concerns the "identification of peptide compounds containing a sequence which is at least 80% identical to a sequence of approximately 9 to 10 consecutive amino acids of the sequence SEQ ID N° 1". However, the steps of this method appear to have no connection with the object of the said method. None of the method steps refers to SEQ ID N° 1. The two steps of the method involve a selection based on the immunological properties of the peptide compounds, whereas the object of the method as defined in Claim 4 makes no reference to the immunological properties of the peptide compounds. Claim 4 is therefore unclear (PCT Article 6).

10. The word "approximately" as used in Claims 4, 6 and 7 is vague and equivocal, creating doubt as to the meaning of the technical feature to which it refers. Consequently, the subject matter of these claims is not clearly defined (PCT Article 6).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/01791

VIII. Certain observations on the international application

11. The method of Claim 6 is not a method for obtaining a peptide compound and it can therefore not enable the peptide compound of Claim 7 to be obtained.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application No. :

U.S. National Serial No. :

Filed :

PCT International Application No. : PCT/FR00/01791

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, the below named translator, hereby declare that:

My name and post office address are as stated below;

That I am knowledgeable in the French language in which the below identified international application was filed, and that, to the best of my knowledge and belief, the English translation of the amended sheets of the international application No. PCT/FR00/01791 is a true and complete translation of the amended sheets of the above identified international application as filed.

I hereby declare that all the statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the patent application issued thereon.

Date: December 12, 2001



Full name of the translator :

Elaine Patricia PARRISH

For and on behalf of RWS Group plc

Post Office Address :

Europa House, Marsham Way,
Gerrards Cross, Buckinghamshire,
England.

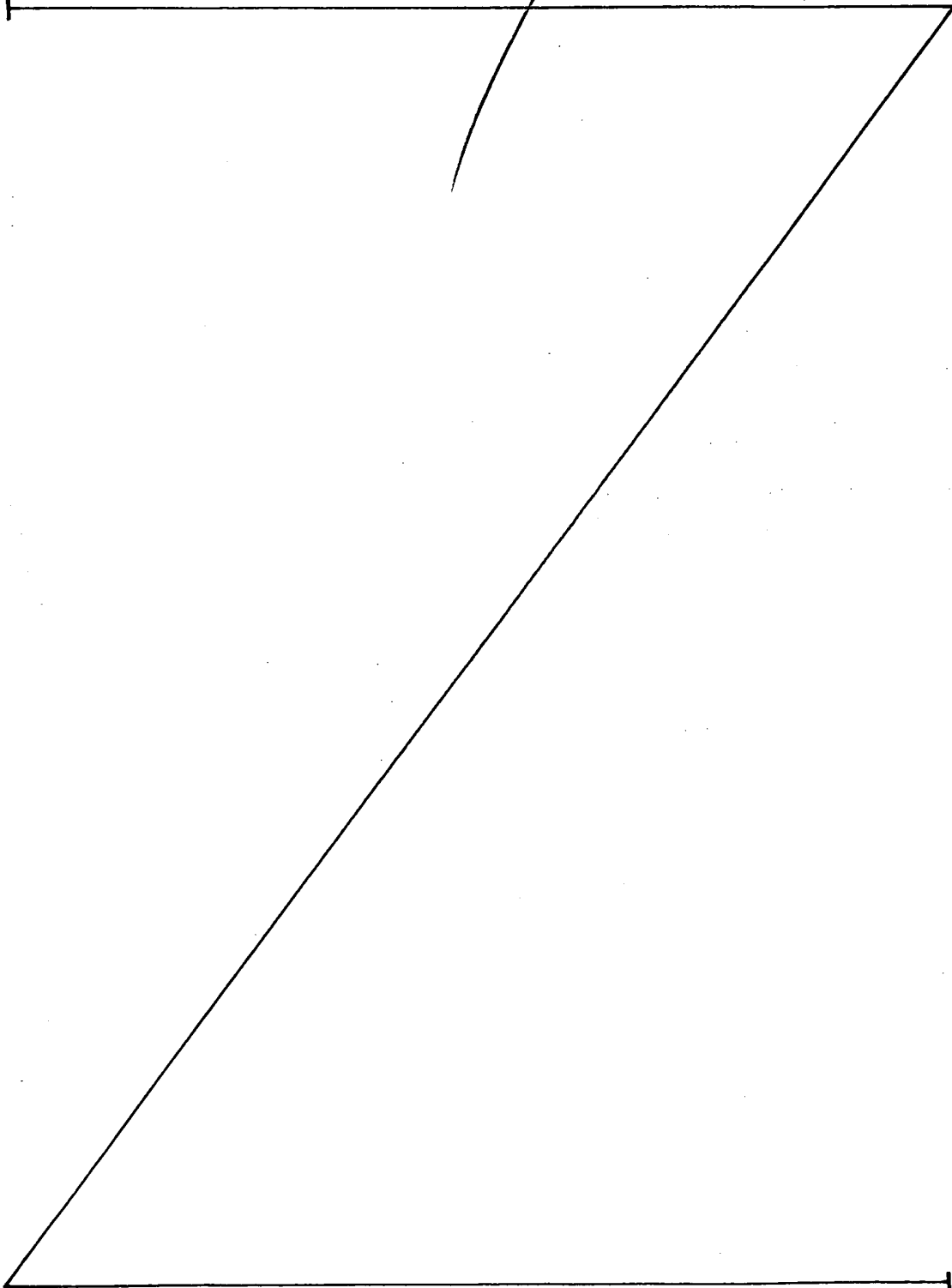
THIS PAGE BLANK (USPTO)

- b) introducing an additional point modification
(for example a post-translational modification)
or mutation at residues 4, 5, 6, 7 or 8,
c) determining the immunogenicity of the peptide
fragments obtained in step b), preferably by
carrying out an Elispot assay.
7. A peptide compound which can be obtained using a
method as claimed in claim 6, characterized in
that it comprises a sequence of approximately 9 to
10 amino acids of the sequence SEQ ID No. 1 which
has a mutation or a modification with respect to
the sequence SEQ ID No. 1 and in that it causes a
specific T response.
8. A peptide compound as claimed in claim 7,
characterized in that it is derived from the
sequence SPRWWPTCL (SEQ ID No. 2).
9. A DNA fragment encoding at least one peptide
fragment of one of claims 1 to 3, 5, 7 and 8.
10. A DNA fragment as claimed in claim 9,
characterized in that it comprises a sequence
which has at least 50% identity with a sequence of
at least 24 consecutive nucleotides of the
sequence SEQ ID No. 3.
11. A vector for expressing a peptide fragment as
claimed in one of [lacuna] 1 to 3, 5, 7 and 8,
containing a DNA fragment of claim 10 fused to a
promoter which is effective in eukaryotic cells
and/or in prokaryotic cells, in particular in
human cells.

Do not enter

THIS PAGE BLANK (USPTO)

12. An expression vector as claimed in claim 11, also comprising one or more selection marker(s) and, optionally, one or more



THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT



REC'D 24 SEP 2001

WIPO

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 341022/18280	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/01791	Date du dépôt international (jour/mois/année) 27/06/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 28/06/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C07K7/06		
Déposant INSTITUT GUSTAVE ROUSSY et al.		
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 7 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent 1 feuilles.</p>		
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none">I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapportII <input type="checkbox"/> PrioritéIII <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielleIV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'inventionV <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclarationVI <input type="checkbox"/> Certains documents citésVII <input type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationaleVIII <input checked="" type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale		
Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 23/01/2001	Date d'achèvement du présent rapport 20.09.2001	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Loubradou, G N° de téléphone +49 89 2399 8543 	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/01791

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-32 version initiale

Revendications, N°:

1-5,13-36 version initiale

6-12 reçue(s) le 13/08/2001 avec la lettre du 10/08/2001

Dessins, feuilles:

1/10-10/10 version initiale

Partie de la demande réservée au listage des séquences, pages:

1-3, telles que initialement déposées

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☒ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01791

- ☒ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffirable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n^{os} :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-8, 11-31
	Non : Revendications 9-10, 32-36
Activité inventive	Oui : Revendications 1-8, 17, 24-30
	Non : Revendications 9-16, 18-23, 31-36
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-36
	Non : Revendications

2. Citations et explications
voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Il est fait référence aux documents suivants:

D1: DATABASE GENEMBL [en ligne] 28 avril 1997 (1997-04-28) SCHWER ET AL.: 'H.sapiens mRNA for putative carboxylesterase' XP002135540 cité dans la demande -& SCHWER ET AL.: 'Molecular cloning and characterization of a novel putative carboxylesterase, present in human intestine and liver' BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 233, no. 1, 1997, pages 117-120, XP000891817

D2: DATABASE GENEMBL [en ligne] 25 novembre 1997 (1997-11-25) SONE, T.: 'Homo sapiens mRNA for carboxylesterase, complete cds.' XP002135542

D3: WO 97 29183 A (US HEALTH ; HWU PATRICK (US); REEVES MARK (US); ROSENBERG STEVEN A) 14 août 1997 (1997-08-14)

Concernant le point V

Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. La formulation des revendications portant sur des fragments d'ADN est telle que l'objet des dites revendications inclue la séquence codant pour la carboxyestérase intestinale humaine. De ce fait les documents D1 et D2 sont préjudiciables à la nouveauté de l'objet des revendications 9 et 10 (Article 33.2 PCT).
2. Les composés peptidiques des revendications 1 à 3, 5, 7 et 8 comprennent des séquences qui ne sont pas définies. Ils peuvent donc comprendre n'importe quel épitope de l'art antérieur. De ce fait, tous les anticorps de l'art antérieur sont préjudiciable à la nouveauté de la revendication 32 (Article 33.2 PCT).
En conséquence, l'objet des revendications 33 à 36 n'est également pas considéré nouveau (Article 33.2 PCT).
De plus le procédé de production d'un anticorps de la revendication 31 ne semble pas impliquer d'activité inventive (Article 33.3 PCT).
3. Par ailleurs, les revendications 11 à 16 et 18 à 23 (dans la mesure où elles font référence aux fragments d'ADN des revendications 9 et 10 qui ne sont pas

THIS PAGE BLANK (USPTO)

considérés nouveaux) découlent de façon évidente de l'objet des revendications 9 et 10 au vu des connaissances générales de l'homme du métier ou au vu de D3 pour les revendications faisant référence aux cellules dendritiques. De ce fait, l'objet des revendications 11 à 16 et 18 à 23 est considéré comme n'impliquant pas d'activité inventive (Article 33.3 PCT).

4. Le polypeptide de séquence SEQ ID N°1 est nouveau et son identification n'est pas suggérée dans l'art antérieur cité dans le Rapport de Recherche Internationale. Il est considéré que ledit polypeptide implique une activité inventive du fait de la présence d'au moins une séquence, SPRWWPTCL, entraînant une réponse T spécifique et pouvant être utilisé pour le traitement de certains carcinomes. Par ailleurs, aucune séquence comprenant une séquence d'au moins 8 acides aminés consécutifs de la séquence SEQ ID N°1, une séquence ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SPRWWPTCL ou une séquence ayant 80% d'identité avec une séquence de 9 à 10 acides aminés consécutifs de la séquence de SEQ ID N°1 n'a été identifiée dans le Rapport de Recherche Internationale. Il est donc considéré que les revendications 1 à 8 ainsi que que les revendication faisant exclusivement référence aux composés des revendications 1 à 8 (revendications 17 et 24 à 30) satisfont aux exigences de l'Article 33 alinéas 2 et 3 du PCT.

Concernant le point VIII

Observations relatives à la demande internationale

5. Un problème de clarté quant à la relation de dépendance existant entre les revendications 1 et 2 se pose. Il n'est pas clair, si le composé de la revendication 2 doit comprendre **à la fois** au moins 8 acides aminés consécutifs de la séquence SEQ ID N°1 **et** une séquence ayant au moins 80 % d'identité avec la séquence SPRWWPTCL ou si la seconde caractéristique mentionnée se substitue à la première. Dans le second cas l'objet de la revendication 2 comprend des composés qui ne sont pas inclus dans le revendication 1 et la revendication 2 ne peut donc pas être une revendication dépendante de la revendication 1.
6. Un produit peut être défini en terme du procédé permettant de l'obtenir s'il n'existe pas d'autres possibilités de définir clairement ledit produit. Ce n'est pas le cas

THIS PAGE BLANK (USPTO)

pour les composés des revendications 5, 7 et 8, ils devraient donc être définis par leurs caractéristiques techniques.

7. Par ailleurs, dans le cas présent, il semblerait préférable de limiter le nombre de revendications indépendantes portant sur un composé peptidique à une seule revendication indépendante.

Il est à noter qu'un problème d'unité est susceptible d'apparaître, s'il n'existe pas de concept nouveau et inventif commun à l'ensemble des revendications portant sur un composé peptidique (revendications 1 à 3, 5, 7 et 8).

8. Les composés peptidiques des revendications 1, 3 et 5 ne satisfont pas aux exigences de l'Article 5 du PCT. L'homme du métier ne peut déduire de l'enseignement de la présente demande quelles sont les composés peptidiques dérivées de la séquence SEQ ID N° 1 qui sont susceptibles d'entraîner une réponse T spécifique sans être soumis à une lourde et incertaine charge expérimentale. Il n'existe en effet, aucune indication suggérant qu'un dit composé peptidique différent de SPRWWPTCL puisse entraîner une réponse T spécifique. Cette objection s'applique a fortiori aux revendication 7 et 8 dont les composés peptidiques sont dérivés des composés peptidiques des revendications 1, 3 et 5 par introduction d'une mutation ou d'une altération non définie afin d'augmenter l'immunogénicité des composés peptidiques des revendications 1, 3 et 5. A présent seuls les composés peptidiques comprenant une séquence ayant au moins 80% d'identité avec la séquence SPRWWPTCL semblent satisfaire aux exigences de l'Article 5 du PCT.

9. Le procédé de la revendication 4 porte sur l'identification de composés peptidiques comprenant une séquence ayant au moins 80% d'identité avec une séquence d'environ 9 à 10 acide aminés consécutifs de la séquence SEQ ID N° 1". Cependant les étapes du dit procédé ne semblent avoir aucun lien avec l'objet du dit procédé. Aucune des étapes du procédé ne fait référence à la séquence de SEQ ID N° 1. Les deux étapes du procédé font intervenir une sélection liée aux propriétés immunologique des composés peptidiques alors que l'objet du procédé tel qu'il est défini dans la revendication 4 ne fait aucunement référence aux propriétés immunologiques des composés peptidiques. La revendication 4 manque donc de clarté (Article 6 PCT)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10. Le terme "environ" utilisé dans les revendications 4, 6 et 7 est vague et équivoque, et laissent un doute quant à la signification de la caractéristique technique à laquelle il se réfère. L'objet des dites revendications n'est donc pas clairement défini (Article 6 PCT).
11. Le procédé de la revendication 6 n'est pas un procédé d'obtention d'un composé peptidique, il ne peut donc pas permettre d'obtenir le composé peptidique de la revendication 7.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- b) introduction d'une mutation ou d'une altération (par exemple une modification post traductionnelle) ponctuelle supplémentaire au niveau des résidus 4, 5, 6, 7 ou 8,
- c) détermination de l'immunogénicité des fragments peptidiques obtenus à l'étape b), de préférence en effectuant un test Elispot.
- 5
7. Composé peptidique susceptible d'être obtenu à partir d'un procédé selon la revendication 6 caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'environ 9 à 10 acides aminés de la séquence SEQ ID N°1 présentant une mutation ou une altération par rapport à la séquence SEQ ID N°1, et ce qu'il entraîne une réponse T spécifique.
- 10
8. Composé peptidique selon la revendication 7 caractérisé en ce qu'il dérive de la séquence SPRWWPTCL (SEQ ID N°2).
- 15
9. Fragment d'ADN codant au moins pour un fragment peptidique de l'une des revendications 1 à 3, 5, 7 et 8.
10. Fragment d'ADN selon la revendication 9 caractérisé en qu'il comprend une séquence ayant au moins 50% d'identité avec une séquence d'au moins 24 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°3.
- 20
11. Vecteur d'expression d'un fragment peptidique selon l'une des 1 à 3, 5, 7 et 8 contenant un fragment d'ADN de la revendication 10 fusionné à un promoteur efficace dans les cellules eucaryotes, et/ou dans les cellules procaryotes, en particulier dans les cellules humaines.
- 25
12. Vecteur d'expression selon la revendication 11 comprenant en outre un ou plusieurs marqueur(s) de sélection et éventuellement une ou plusieurs

THIS PAGE BLANK (USPTO)

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application No. :

U.S. National Serial No. :

Filed :

PCT International Application No. : PCT/FR00/01791

VERIFICATION OF A TRANSLATION


I, the below named translator, hereby declare that :

My name and post office address are as stated below ;

That I am knowledgeable in the French language in which the below identified International application was filed, and that, to the best of my knowledge and belief, the English translation of the international application No. PCT/FR00/01791 is a true and complete translation of the above identified international application as filed.

I hereby declare that all the statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true ; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the patent application issued thereon.

Date : December 13, 2001

Full name of the translator : Nicolas TORNO 
For and on behalf of Cabinet Regimbeau

Post Office Address : 20 rue de Chazelles
75847 Paris Cedex 17 / France

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire 341022/18280	POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER	
Demande internationale n° PCT/FR 00/ 01791	Date du dépôt international (jour/mois/année) 27/06/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 28/06/1999
Déposant INSTITUT GUSTAVE ROUSSY et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- ☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☒ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☒ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- ☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'abrégé,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- ☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°

- ☐ suggérée par le déposant.
- ☒ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- ☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

4

☐ Aucune des figures n'est à publier.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
4 janvier 2001 (04.01.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/00784 A2

- (51) Classification internationale des brevets⁷: C12N (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).
- (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/01791 (81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) Date de dépôt international: 27 juin 2000 (27.06.2000)
- (25) Langue de dépôt: français
- (26) Langue de publication: français
- (30) Données relatives à la priorité:
99/08224 28 juin 1999 (28.06.1999) FR (84) États désignés (*régional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*): INSTITUT GUSTAVE ROUSSY [FR/FR]; 39, rue Camille Desmoulins, F-98400 Villejuif (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): RONSIN, Christophe [FR/FR]; 3, rue de l'Abbé Pouchard, F-94160 Saint-Mande (FR). SCOTT, Véronique [FR/FR]; 32, rue Pierre Marie Derrien, F-94500 Champigny (FR). TRIEBEL, Frédéric [FR/FR]; 10, rue Saint-Louis, F-78000 Versailles (FR).
- Publiée:
— Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: COMPOUND DERIVED FROM AN OFFSET ORF OF THE ICE GENE

(54) Titre: COMPOSE PEPTIDIQUE DERIVE D'UNE ORF DECALEE DU GENE iCE

(57) Abstract: The invention concerns a peptide compound, causing a T specific response from tumours, comprising a sequence of at least 8 consecutive amino acids of the peptide sequence coded by a phase offset sequence of the iCE gene. The invention also concerns a pharmaceutical composition comprising said peptide compound and the use of said compounds for making a medicine for cancer treatment, in particular for treating solid tumours.

(57) Abrégé: La présente invention concerne un composé peptidique, entraînant une réponse T spécifique des tumeurs, qui comprend une séquence d'au moins 8 acides aminés consécutifs de la séquence peptidique codée par une séquence en phase décalée du gène iCE. L'invention porte également sur une composition pharmaceutique comportant ledit composé peptidique et sur l'utilisation de ces composés pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du cancer, en particulier au traitement des tumeurs solides.

WO 01/00784 A2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

COMPOSE PEPTIDIQUE DERIVE D'UNE ORF DECALEE DU GENE iCE.

5 La présente invention concerne un composé peptidique, entraînant une réponse T spécifique des tumeurs, qui comprend une séquence d'au moins 8 acides aminés consécutifs de la séquence peptidique codée par une séquence en phase décalée du gène iCE. L'invention porte également sur une composition pharmaceutique comportant ledit composé peptidique et sur l'utilisation de ces composés pour la
10 fabrication d'un médicament destiné au traitement du cancer, en particulier au traitement des tumeurs solides.

Divers produits s'avèrent être reconnus par des cellules T réactives vis-à-vis des tumeurs, la plupart d'entre eux étant isolés à partir de patients présentant des
15 mélanomes. Certains de ces antigènes (Ag) représentent des produits de gènes non mutés dont l'expression dans des tissus d'adultes normaux est limitée aux testicules (MAGE-1, MAGE-3, BAGE et GAGE) (1-4). D'autres gènes non mutés sont des antigènes de différenciation qui sont aussi exprimés, par exemple, dans des mélanocytes normaux mais pas dans d'autres tissus normaux. Ceux-ci comprennent
20 les produits géniques de lignée mélanocytaire MART-1/MelanA (5, 6), gp100 (6), tyrosinase (7, 8) et gp75 (9). Les cellules T réactives vis-à-vis des mélanomes s'avèrent aussi reconnaître des produits mutés des gènes de α -caténine (10), MUM1 (11) et CDK-4 (12). Les cellules T réactives vis-à-vis du carcinome de cellules rénales (RCC) s'avèrent aussi reconnaître des produits de gènes mutés
25 ponctuellement tels que HLA-A2 (13) ou HSP70-2 (14).

En outre, certains Ag reconnus par des cellules T réactives peuvent être générés par des produits de transcription modifiés, comprenant des séquences introniques, comme dans le cas de MUM-1 (11), N-acétylglucosaminyltransférase-V (GnT-V)
30 (15) ou gp100 (16). La surveillance par les cellules T de l'intégrité des cellules peut se focaliser sur des peptides codés par une phase de lecture ouverte (ORF) alternative située à l'intérieur de l'ORF primaire, comme dans le cas de gp75/TRP-1 (17) et NY-

E50-1 (18). Peu d'exemples existent dans la littérature sur l'utilisation des ORF alternatives dans les eucaryotes et la signification biologique des produits correspondants est inconnue. Néanmoins, on peut supposer que ces produits pourraient servir de cibles antigéniques et augmenter l'efficacité de la surveillance immunitaire. En effet, Il y a une relation de plus en plus nette entre le contrôle traductionnel anormal de l'expression de gènes (comme pour c-mys ou FGF-2) (19-21) et l'apparition d'un cancer, et donc les peptides immunogéniques dans des tumeurs peuvent provenir de peptides dérivant de l'ORF primaire mais également d'ORF alternatives.

Le criblage d'une bibliothèque d'ADNc avec un clone de cellules T réactives vis-à-vis du carcinome de cellules rénales (RCC) de restriction HLA-B7, dérivant de lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) qui ont été amplifiés par clonage in vivo, a conduit dans le cadre de la présente invention à l'isolation d'un nonamère codé par une phase ouverte de lecture (ORF) alternative (A + 1 décalage de phase) du gène de la carboxyle estérase intestinale (iCE). Ce peptide se fixe aux molécules présentant HLA-B*0702, comme déterminé dans un test de fixation par immunofluorescence en utilisant des cellules T2 transfectées. L'expression constitutive de cette protéine d'ORF alternative a été observée dans toutes les lignées de cellules rénales HLA-B7* transformées qui étaient reconnues dans des essais de cytotoxicité par les TIL. Le gène de iCE est transcrit dans des tumeurs RCC ainsi que dans des tissus normaux de foie, d'intestin ou de rein. Une mutation du site d'initiation de traduction ATG naturel n'altère pas la reconnaissance, ce qui montre que le décalage de cadre (c'est-à-dire le glissement du ribosome vers l'avant) et le recodage ne sont pas les mécanismes impliqués. De plus, une mutation ponctuelle des trois codons AUG pouvant servir de sites d'initiation de traduction alternatifs dans l'ORF +1 n'abolit pas la reconnaissance, tandis que la mutation d'un codon ACG en amont le fait, indiquant que ce dernier codon initie la traduction de l'ORF alternative. De manière inattendue, cette ORF alternative est donc initiée à partir d'un codon cryptique non-AUG (ACG).

Description

Ainsi, la présente invention concerne un composé peptidique, entraînant une réponse T spécifique des tumeurs, qui comprend une séquence d'au moins 8 acides aminés consécutifs de la séquence peptidique codée par la séquence en phase décalée (A+1 ou A+2) du gène iCE. La séquence nucléotidique et peptidique de iCE (Homo sapiens intestinal carboxylesterase; liver carboxylesterase-2) est disponible sur le site www.ncbi.nlm.nih.gov sous le numéro d'accèsion NM_003869.

La publication Schwer,H., Langmann,T., Daig,R., Becker,A., Aslanidis,C. and Schmitz,G. Molecular cloning and characterization of a novel putative carboxylesterase, present in human intestine and liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 233 (1), 117-120 (1997) (MEDLINE 97289502) est incorporé dans la description par référence.

L'invention concerne plus spécifiquement un composé peptidique, entraînant une réponse T spécifique, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'au moins 8 acides aminés consécutifs de la séquence SEQ ID N°1 suivante :

TVVRLFLAWLPCMMVPCWLPWRTWWSSSTAWVSWASSALETSTQPAT
GATWTKWLHYAGSSRISPTLEATLTVSPFLASLRVARVCLRLLCPPYPKDSST
EPSWRVAWPSCPASLPAQLMSSPRWWPTCLPVTCLTLRPWWAACGARVKR
RFLQLTSLSR.

On peut citer en particulier un composé peptidique ayant au moins 80 % d'identité avec la séquence SPRWWPTCL (SEQ ID N°2).

25

L'invention porte également sur un procédé d'identification de composés peptidiques comprenant une séquence ayant au moins 80% d'identité avec une séquence d'environ 9 à 10 acides aminés consécutifs de la séquence SEQ ID N°1 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) Détermination de fragments possédant une séquence d'environ 9 à 10 acides aminés comportant un motif d'ancrage pour une molécule HLA donnée,
- b) détermination de l'immunogénicité des fragments peptidiques obtenus à l'étape a), de préférence en effectuant un test Elispot.

5

L'invention a pour objet les composés peptidiques susceptibles d'être obtenus à partir de ce procédé.

Les fragments peptidiques à tester peuvent aisément être obtenus par synthèse chimique à partir des connaissances générales dans le domaine technique.

Le test Elispot est largement décrit dans les documents de la technique antérieure. Par exemple, Herr et al, (1998) concerne une méthode Elispot pour détecter et quantifier des lymphocytes T CD8 + sécrétant du TNF- α . En résumé, des plaques MultiScreen-HA (Millipore, Bedford, MA) sont recouvertes avec un anticorps anti-TNF- α (clone 195 ; Boehringer Mannheim) et des lymphocytes T CD8 + sont ajoutés en présence de peptides antigéniques. Le TNF- α sécrété est détecté avec un anticorps anti-TNF- α de lapin (Serotec, Oxford, UK), un anticorps anti-IgG de lapin couplé avec de la biotine (Boehringer Mannheim) et le complexe biotine-avidine-peroxidase (Vector, Burlingame, CA). Le nombre et la surface des zones où la cytokine est présente sont déterminés automatiquement par ordinateur, (Herr et al, 1997). D'autres documents tels que Herr et al, (1996) section matériels et méthodes paragraphe 2 pages 132 à 135, et Scheibenbogen et al, (1997) page 933 décrivent cette méthode et sont également incorporés dans la description par référence.

En outre, l'invention a trait à un procédé de mise en évidence de mutations ou d'altérations ponctuelles artificielles susceptibles d'augmenter l'immunogénicité des composés peptidiques décrits ci-dessus, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- a) Détermination de fragments possédant une séquence d'environ 9 à 10 acides aminés comportant un motif d'ancrage pour une molécule HLA donnée,

- b) introduction d'une mutation ou d'une altération (par exemple une modification post traductionnelle) ponctuelle supplémentaire au niveau des résidus 4, 5, 6, 7 ou 8,
- c) détermination de l'immunogénicité des fragments peptidiques obtenus à l'étape b), de préférence en effectuant un test Elispot.

Ce procédé est bien connu par l'homme du métier. On peut notamment incorporer par référence dans la description les enseignements qui se trouvent à l'adresse internet suivante:

10 www.bimas.dcrn.nih.gov/molbio/hla_bind/

Ce procédé permet de déterminer toute mutation ou altération ponctuelle artificielle (non présente dans les tumeurs humaines) qui serait susceptible d'améliorer le principe actif (le peptide muté immunogène) en employant la méthode dite de «reverse immunology ». A partir de la connaissance de la séquence en acides aminés d'une protéine, il est possible de prédire quels sont les peptides pouvant se lier à une poche HLA quelle que soit sa spécificité (HLA-A2, HLA-A1, HLA-B7...), puis de tester ces peptides in vitro pour leur capacité à se lier effectivement à l'allèle HLA considéré, puis à introduire une mutation ou une altération ponctuelle sur les acides aminés sur certaines positions critiques pour l'affinité. Le programme informatique BIMAS permet d'obtenir une telle prédiction. Les règles générales concernant les acides aminés impliqués dans l'ancrage aux molécules HLA sont présentées dans Parker et al, (1992 et 1994) et Rammensee et al, (1995). Ces informations sont incorporées par référence dans la description. Bien entendu, le procédé selon l'invention ne se limite pas à l'utilisation du programme BIMAS, et peut être mis en œuvre avec tout programme équivalent.

Dans un autre aspect, l'invention a pour objet un composé peptidique susceptible d'être obtenu à partir d'un procédé mentionné ci-dessus caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'environ 9 à 10 acides aminés de la séquence SEQ ID N°1 présentant au moins une mutation ou une altération par rapport à la séquence SEQ ID N°1, et ce qu'il entraîne une réponse T spécifique. Un tel composé peptidique peut notamment dériver de la séquence SPRWWPTCL (SEQ ID N°2).

On entend par « composé peptidique » dans le cadre de l'invention, une entité constitué au minimum par un fragment peptidique dérivé du polypeptide codé par une ORF alternative A+1 ou A+2 de iCE ou par une succession desdits fragments peptidiques, et ayant éventuellement un ou plusieurs autres éléments différents des acides aminés naturels ou non naturels. Ces éléments ont pour but de protéger chimiquement ou physiquement lesdits fragments peptidiques, et/ou de favoriser leur absorption par l'organisme, et/ou leur administration, et/ou leur biodisponibilité. Par exemple, cette protection permet aux peptides d'atteindre leurs cibles sans subir l'action de diverses protéases présentes dans l'organisme. De telles modifications chimiques peuvent également augmenter l'affinité d'un peptide antigénique pour les molécules HLA-A2 et permettre une efficacité accrue du vaccin in vivo, Rosenberg et al, (1998).

Lesdits éléments peuvent être par exemple:

- Des groupes chimiques protecteurs connus par l'homme du métier réagissant aux extrémités NH₂ et/ou COOH d'un peptide, cette modification ne baissant pas significativement le caractère immunogénique du peptide.
- Des groupes chimiques améliorant l'efficacité du vaccin in vivo.
- Des lipides ou des acides gras que l'on attache de façon covalente aux fragments peptidiques pour former des composés peptidiques appelés lipopeptides. L'acide palmitoïque en est un exemple parmi d'autres, Vitiello et al, (1995), incorporé dans la description par référence.
- Une protéine porteuse desdits fragments peptidiques possédant des sites de restriction et permettant l'acheminement des fragments peptidiques intacts jusqu'à leurs sites d'action dans l'organisme.

Ainsi, le composé peptidique selon l'invention peut comporter au moins un élément différent des acides aminés naturels.

Un mode supplémentaire de réalisation de l'invention concerne un fragment d'ADN codant au moins pour un fragment peptidique défini ci-dessus. Ce fragment peut

comprendre une séquence ayant au moins 50% d'identité avec une séquence d'au moins 24 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°3 suivante :

```

acgggtggcgcttgttttggcatggcttccttgatgatgggtccatgctggctgccttggaacgtgggtgggtcatca
5  tccagtaccgcctgggtgtcctgggcttcttcagcactggagacaagcacgcaaccggcaactggggctacctggacca
   agtggctgcactacgtgggtccagcagaatatcgcccactttggaggcaaccctgaccgtgtcaccattttggcgagtc
   tgcgggtggcagagtgtgtcttcgcttgtgtgtcccccataccaaggactcttcacggagccatcatggagagtgg
   cgtggccctcctgcccggcctcattgccagctcagctgatgtcatctccacgggtgggtggccaacctgtctgcctgtgacca
   agttgactctgaggccctgggtgggtgcctgcggggcaagagtaaaggagattctgcaattaacaagccttcaagat
10 gatccccggagtgggtggatggggtcttcctgcc

```

Cette séquence correspond à l'ORF alternative A+1, du gène de iCE qui est exprimée dans les cellules tumorales. Le produit d'expression de cette ORF est reconnu par un clone de cellules T réactives vis-à-vis du RCC à restriction par HLA-B7. Les TIL
15 réactifs sont amplifiés in situ sur le site de la tumeur.

On entend par « fragments d'ADN » des fragments simples brins, double brins, d'ADN, d'ADNc et/ou d'ARN. La séquence nucléotidique correspondant à la séquence d'acides aminés desdits fragments peptidiques peut varier de manière à
20 comprendre tous les différents codons possibles pour un acide aminé donné selon le principe de la dégénérescence du code génétique. La présente invention a également pour objet un vecteur d'expression d'un fragment peptidique contenant un fragment d'ADN ci-dessus mentionné, fusionné à un promoteur fort et efficace dans les cellules eucaryotes, et/ou dans les cellules procaryotes, en particulier dans les
25 cellules humaines. Le vecteur peut être viral, plasmidique, ou un pseudo-vecteur et peut comporter des marqueurs de sélection et exprimer des adjuvants immunologiques tels que des cytokines et/ou des lymphokines.

L'invention concerne également des cellules dendritiques chargées en composés peptidiques, et des cellules dendritiques transformées par le vecteur d'expression
30 exprimant les fragments peptidiques. Ces cellules peuvent être aussi des macrophages. Nestle et al, (1998), décrit une méthode de vaccination qui consiste à charger les cellules dendritiques prises à un patient par des peptides antigéniques (en

culture in vitro), et les injecter dans le système lymphatique de ce même patient. Cette publication est citée dans la description par référence.

Un autre aspect de l'invention a pour objet une composition pharmaceutique
5 comprenant un composé peptidique ou un mélange de composés peptidiques selon l'invention et un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Cette composition peut comporter en outre un ou plusieurs adjuvants immunologiques, notamment des facteurs cytotoxiques des tumeurs.

L'invention porte aussi sur une composition pharmaceutique comprenant un vecteur
10 d'expression tel que mentionné ci-dessus et un véhicule pharmaceutiquement acceptable ou un fragment d'ADN selon l'invention ou bien encore les cellules indiquées ci-dessus et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

La composition pharmaceutique ou le produit de combinaison selon l'invention peut
15 comporter en outre un ou plusieurs adjuvants immunologiques, notamment des agents cytotoxiques des tumeurs. Ces produits peuvent comporter un véhicule pharmaceutique compatible avec une administration IV, subcutanée, orale, ou nasale, de préférence sélectionné parmi les liposomes, les nano-particules, ou les émulsions lipidiques, chargés positivement ou négativement.

20 Un autre aspect de l'invention porte sur l'utilisation d'un composé peptidique tel que défini ci-dessus pour la fabrication d'un médicament, notamment destiné au traitement du cancer, en particulier des tumeurs solides, notamment des carcinomes, des mélanomes, des neuroblastomes, de préférence des hépatocarcinomes et des
25 adénocarcinomes du côlon ou du rein. Ce médicament peut être destiné à une immunisation ex vivo, consistant notamment à induire in vitro des CTL spécifiques de tumeurs, les expandre et les réinjectés, ladite induction pouvant être effectuée à l'aide de cellules dendritiques chargées ou à une immunisation in vivo. L'invention porte aussi sur l'utilisation dudit composé peptidique pour augmenter en milieu de
30 culture la population des CTL des tumeurs et/ou induire la sécrétion par lesdits CTL de facteurs cytotoxiques tels que par exemple IL-2, IFN- γ et TNF et/ou pour stimuler

les défenses immunitaires, en particulier pour augmenter la population des CTL des tumeurs et/ou induire la sécrétion par lesdits CTL de facteurs cytotoxiques tels que par exemple IL-2, IFN- γ et TNF.

- 5 Dans un mode supplémentaire de mise en œuvre, l'invention a trait à un procédé de production d'un anticorps reconnaissant un composé peptidique décrit précédemment comprenant les étapes consistant à :
- a) Immuniser un mammifère avec ledit composé peptidique,
 - b) isoler un anticorps monoclonal qui se lie audit peptide dans un essai
- 10 immunologique .

L'invention vise également un anticorps monoclonal susceptible d'être obtenu à partir de ce procédé.

- 15 L'invention vise également un procédé de détection d'un peptide ou polypeptide codé par l'ORF A+1 de iCE, comprenant les étapes consistant à :
- a) Mettre en contact un échantillon prélevé chez un individu avec un anticorps monoclonal mentionné ci-dessus,
 - b) permettre la formation du complexe anticorps-peptide ou polypeptide,
 - 20 c) détecter ledit peptide ou polypeptide au moyen d'un marqueur détectable dans le complexe ou qui se lie au complexe ;

et une trousse de diagnostic comportant notamment ledit anticorps pour la détection du cancer, notamment pour le pronostique du cancer déclaré chez un individu.

- Une composition comprenant notamment ledit anticorps monoclonal et un véhicule
- 25 pharmaceutiquement acceptable peut également être utile dans le cadre du traitement du cancer.

- L'ADNc de iCE a été isolé à l'origine à partir d'une bibliothèque d'ADNc d'intestin grêle humain (31). Il présente une homologie de 65 % avec d'autres carboxyle
- 30 estérases de différentes espèces mammifères. Il est exprimé dans l'intestin, le foie ou

le rein humain et semble jouer un rôle important pour le contrôle xénobiotique et la détoxification de la muqueuse intestinale (31). Une grande série d'épitopes de cellules T codés dans la région nucléotidique minimale de la ORF de iCE régulière a été testée et aucun d'entre eux n'a été reconnu dans le contexte de l'élément de restriction HLA-B*0702 de classe I. Au contraire, une ORF de 453 nt codée dans cette région suivant un décalage de phase +1 s'est avérée coder pour un nonapeptide avec des résidus d'ancrage à HLA-B7 sur les positions 2, 3 et 9 (SPRWWPTCL, SEQ ID n°2). Une lyse semi-maximale a été obtenue avec moins de 10^{-6} M de nonapeptide dans des essais de sensibilisation de cible (target sensitization assays). La fixation de ce nonapeptide à des cellules T2 transfectées par HLA-B*0702 est stable dans le temps, suggérant que de faibles quantités de l'expression de cette ORF alternative sont suffisantes pour induire une reconnaissance de cellules T in vitro ainsi qu'une prolifération de cellules T in vivo, comme montré, pour ce dernier cas, par l'amplification in situ au niveau du site tumoral de la sous-population de TIL correspondante.

Les résultats obtenus dans le cadre de l'invention révèlent qu'un nouveau mécanisme est impliqué dans la génération d'épitopes de cellules T. Une ORF alternative induite par un codon non-AUG cryptique conduisant à une phase de lecture traductionnelle +1 s'est avérée coder un Ag de tumeur reconnu par des TIL. Dans deux autres exemples, gp75/TRP-1 (17) et NY-E50-1 (18), des peptides reconnus par des TIL sont codés par une ORF alternative située à l'intérieur de la ORF primaire. Un mécanisme par lequel l'ORF alternative est traduite a été suggéré pour gp75/TRP-1 (17), où la reconnaissance était affectée par la présence d'un AUG interne précédant l'épitope. En plus de ce mécanisme de criblage ribosomal, un décalage de phase ribosomal (39, 40) a été suggéré pour la production d'épitopes de cellules T (41) mais, dans le cas du gène iCE, cette possibilité est exclue car la mutation du site d'initiation de traduction ATG naturel n'affecte pas la reconnaissance des peptides. En fait, la présence du premier site d'initiation de traduction interne cryptique (un codon ACG en position 440) dans la ORF alternative +1 de iCE est suffisante pour diriger l'expression de quantités suffisantes de peptide de iCE pour l'activation de cellules T in vitro ainsi que in vivo (c'est-à-dire conduisant à une expansion clonale

de cellules T in situ). Le modèle de balayage fuyant où des ribosomes évitent occasionnellement le premier AUG avec une médiocre séquence consensus de Kozak et initient une traduction sur un AUG en aval peut s'appliquer à iCE du fait de la présence d'une pyrimidine en position +4 à la place d'une purine.

5

A notre connaissance, ceci est le premier exemple d'un épitope codé par une ORF alternative non définie par ATG et reconnu par des cellules T à réactivité tissulaire dans une maladie humaine. Des lignées de cellules rénales HLA-B7+ non transformées, établies in vitro, ont été reconnues dans des essais de cytotoxicité par le clone 3B8 dérivé de TIL. Il a été montré que des initiations de traduction alternatives, non définies par ATG, de la molécule du facteur 2 de croissance de fibroblastes, sont induites dans des cellules stressées ou transformées, par comparaison à celles définies par ATG (20). De façon similaire, l'expression de formes de iCE non initiées par ATG peuvent être régulées positivement dans les tumeurs, conduisant à l'expansion clonale in situ des TIL correspondants. Cette ORF alternative de iCE exprime donc un nouvelle Ag de tumeur intéressant à utiliser en immunothérapie notamment chez des patients présentant un hépatocarcinome ou un adénocarcinome du côlon ou rénal. Plus généralement, les résultats obtenus montrent la possibilité que des ORF alternatives induites par des codons non-AUG dans les 3 phases de lecture traductionnelles puissent coder des épitopes de cellules T dans certaines maladies humaines, telles que le cancer ou des affections auto-immunes.

10

15

20

Pour la suite de la description, on se référera aux légendes des figures présentées ci-dessous.

Légendes

Figure 1 :

(A) Lyse spécifique de lignée cellulaire RCC-1 autologue par le clone 3B8 de CTL.

La cytotoxicité du clone 3B8 vis-à-vis de la lignée cellulaire RCC-1 autologue et des cellules K562 a été testée dans un essai de relargage du chrome standard à différents rapports E:T. Le blocage de la lyse par le mAb W6.32 est également représenté.

(B) Cytotoxicité de 3B8 vis-à-vis de diverses lignées de cellules allogéniques.

3B8 a été testé avec la lignée RCC-1 autologue et diverses lignées de cellules RCC allogéniques (RCC-3, RCC-4, RCC-5) dans un essai au chrome standard à un rapport E:T de 18:1. A titre de témoin, le mAb W6.32 a été utilisé pour bloquer les molécules HLA de classe I impliquées dans la présentation d'antigène.

Figure 2 : Analyse de taille de CDR3 dans des TIL et dans le clone 3B8 utilisant des amorces sélectionnées TCRBV (A) et TCRBJ (B).

L'ARN a été soumis à une transcription inverse et à une amplification sur 40 cycles en utilisant les amorces TCRBV5 et BC. L'ADN obtenu a été copié sur 5 cycles dans une réaction d'élongation utilisant l'amorce fluorescente nidifiée TCRBC (A) ou TCRBJ152 (B) (13 amorces BJ testées, BJ1S1-BJ1S7, BJ2S1-BJ2S6). Les produits amplifiés ont été analysés sur un séquenceur automatisé. Les profils obtenus montrent les tailles en nt (axe des x) et l'intensité de fluorescence (axe des y) des produits amplifiés. Les valeurs FU absolues obtenues pour les pics dominants sont indiquées.

Figure 3 : Stimulation de 3B8 de CTL par des cellules COS-7 co-transfectées de façon transitoire avec le vecteur d'expression pcDNA1 contenant le clone d'ADNc 2C2 ou 3G7 et l'ADNc de HLA-B*0702 autologue.

Les cellules stimulantes témoins comprennent la lignée cellulaire RCC-1 servant de témoin positif et des cellules COS-7 transfectées avec de l'ADNc de HLA-B*0702 seul servant de témoin négatif. L'ADNc de iCE a été co-transfecté de façon transitoire dans des cellules COS-7 avec l'ADNc de HLA-B*0702 et le clone 3B8 a

été ajouté au bout de 48 heures. La production de TNF a été déterminé par son effet cytotoxique sur des cellules WEHI 18 heures plus tard. Les cellules stimulantes témoins comprennent la lignée cellulaire RCC-1 servant de témoin positif et des cellules COS-7 transfectées avec HLA-B*0702 seul servant de témoin négatif.

5

Figure 4 : Localisation de la séquence d'ADNc de iCE codant pour le peptide antigénique reconnu par 3B8.

Il s'agit d'une représentation schématique de la séquence d'ADNc de iCE de pleine longueur, du clone 2C2 d'ADNc et de divers 2C2 d'ADNc tronqués. Les régions 3' et 10 5' non traduites sont représentées par des cadres soulignés. La séquence traduite de iCE humaine est représentée par un cadre plein ; le clone 2C2 d'ADNc est représenté par un cadre pointillé et les 2C2 d'ADNc tronqués sont indiqués par des cadres hachurés. Les nucléotides sont numérotés à partir du codon non-sens ATG naturel. Les petits cadres noirs avec une flèche indiquent l'emplacement de l'amorce P1 et de 15 l'amorce P2. L'ADNc utilisé comme sonde pour l'hybridation du transfert d'ARN est indiqué par une flèche à deux pointes. Sites de restriction (B : Bam HI ; Bs : BstX I ; E : EcoR I ; S : Sma I ; X : Xba I). La reconnaissance par 3B8 de CTL des cellules COS-7 transfectées de façon transitoire avec l'ADNc de HLA-B*0702 autologue et divers ADNc tronqués est indiquée. Les cellules transfectées ont été incubées 20 pendant 24 heures avec 5000 cellules 3B8 et la quantité de TNF a été mesurée dans les surnageants par l'effet de cytotoxicité sur des cellules WEHI-13.

Figure 5 : Lyse de lignées de cellules transformées par EBV autologues incubées avec le peptide codé de iCE par 3B8 de CTL.

25 2000 cellules transformées par EBV ont été incubées et marquées au ⁵¹Cr pendant 1 h en présence du peptide de iCE à restriction HLA-B7 ou un autre peptide témoin à restriction HLA-B7. Le clone 3B8 a ensuite été ajouté à titre d'effecteur en un rapport fixé à 30:1. On a mesuré le relargage du chrome au bout de 4 h.

30 **Figure 6 : Induction de l'expression de HLA-B7 sur des cellules T2 par le peptide de iCE.**

Des cellules T2 ont été incubées à 26°C pendant 16 heures dans du milieu sans sérum avec des peptides à une concentration de 50 µM. Puis les peptides ont de nouveau été ajoutés et les cellules ont été incubées à 37°C. A intervalles de 30 min ou 1 h, des aliquotes de cellules ont été recueillies et on a contrôlé le changement d'expression de HLA-B7 par cytométrie de flux avec un mAb anti-HLA-B7 (HB59). A titre de témoin, un peptide HSP70 à restriction HLA-A2 a été utilisé.

Figure 7 : Analyse de produits de transcription d'ARN de iCE dans diverses lignées cellulaires (A) et divers fragments de tumeur (B).

5 µg d'ARN poly(A)+ (A) et dix µg d'ARN total (B) ont été chargés sur un gel dénaturant de formaldéhyde à 1 % d'agarose. L'ARN a été transféré sur une membrane et le transfert d'ARN a été hybridé avec un fragment de clone 2C2 d'ADNc marqué au 32P, servant de sonde. Une hybridation a été effectuée avec une sonde de glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) à titre de témoin interne pour la charge de quantités uniformes d'ARN pour l'analyse (non représenté).

Figure 8 : Une phase ouverte de lecture non définie par ATG de iCE est reconnue par le 3B8 de CTL.

(A) Séquence de la région codante d'ADNc de iCE avec les phases ouvertes de lecture primaire et alternative (décalage a+1). Les positions des nucléotides (nt) mutés sont représentées en lettres capitales grasses, les codons correspondants sont soulignés et l'emplacement des mutants A-F testés (B) est indiqué au-dessus des codons mutants. La séquence du peptide antigénique codé par la ORF +1 est soulignée.

(B) L'aptitude de mutants ponctuels (A-F) à stimuler la libération de TNF à partir du clone 3B8 après co-transfection avec HLA-B*0702 dans des cellules COS a été testée. Les témoins négatifs comprennent une transfection simulée avec HLA-B*0702 ou l'ADNc de iCE seul ou une co-transfection avec HLA-B*0702 et un plasmide de pcDNA1 témoin.

Exemple 1 : Matériels et méthodes**Lignées cellulaires**

Des cellules K562 ont été cultivées et la lignée de cellules B transformées par EBV
5 provenant du patient 1 dans du milieu constitué de RPMI (Gibco-BRL, Paisley, GB)
supplémenté avec 1 % de L-glutamine 200 mM, 1 % de pyruvate de sodium 200
mM, 1 % de Hepes, 5 % de sérum de veau fœtal (FCS) et 50 UI/ml de pénicilline
(Gibco-BRL, Paisley, GB) a été obtenue. Le clone 13 de WEHI-164 (W13) et les
10 cellules COS-7 ont été cultivées dans du RPMI (Seromed, Biochrom KG, Berlin)
supplémenté avec 1 % de L-glutamine 200 mM, 1 % de pyruvate de sodium 200
mM, 1 % de Hepes, 5 % de sérum de veau fœtal (FCS) et 50 UI/ml de pénicilline.

Patients et établissement des lignées de cellules RCC

Les lignées de cellules RCC ont été établies comme décrit antérieurement (22). Des
15 tumeurs primaires ont été obtenues auprès de patients non traités qui avaient subi une
néphrectomie radicale. La lignée de cellules RCC-1 a été établie à partir du patient 1
(HLA A1, A32, B7, B12-44, Cw5, Cw7), un homme âgé de 56 ans ayant un
carcinome de cellules rénales clair et granulaire sans métastases. Après chirurgie, on
a traité des fragments par digestion enzymatique et on a cultivées les suspensions de
20 cellules tumorales dans du milieu RCC complet (22). Les lignées de cellules
tumorales RCC-2 (HLA A1, A3, B7, B8, Cw7, Cw7), RCC-3 (HLA A1, A29, B22,
B15-62/63, Cw1, Cw7-17), RCC-4 (HLA A3, A19-29, B7, B12-44, Cw7, Cw16),
RCC-5 (HLA A1, A3, B6, B22-56, Cw1, Cw7), RCC-6 (HLA A9-24, A32, B12-44,
B18, Cw5, Cw5), RCC-7 (HLA A1, A28-68, B8, B40-60, Cw3, Cw7), RCC-8 (HLA
25 A2, A10-25, B18, B13, Cw8, Cw6) dérivant de la tumeur primaire des patients 2, 3,
4, 5, 6, 7 et 8, respectivement, ont été maintenues dans du milieu RCC complet.

Génération de CTL à partir de TIL du patient 1

Des TIL autologues ont été générés à partir d'une suspension décongelée de cellules
30 tumorales dissociées. Une culture mixte autologue de lymphocytes/cellules tumorales
(MLTC) a été réalisée comme suit : Au jour 1, des cellules tumorales dissociées ont
étéensemencées à raison de 2×10^6 TIL dans des plaques à fond plat à 6 puits

(Falcon, Becton Dickinson, New Jersey) dans du RPMI 1640 (Gibco-BRL, Paisley, GB) contenant 1 % de L-glutamine 200 mM, 1 % de pyruvate de sodium 200 mM, 8 % de sérum AB humain (Institut Jacques Boy, S.A., Reims, France), 50 UI/ml de pénicilline, supplémenté avec 5 % de facteur de croissance de cellules T (TCGF) et 50 UI/ml d'interleukine-2 humaine (rIL-2) (Roussel Uclaf, Romainville, France), appelé ci-après "milieu complet MLTC". Le milieu complet MLTC a été retiré tous les trois jours selon les besoins, et on l'a remplacé par du milieu MLTC complet frais. Aux jours 7, 15, 21, 2×10^6 TIL ont été re-stimulées avec 2×10^5 cellules tumorales autologues irradiées (100 Gray) ensemencées dans des plaques à fond plat à 6 puits avec du milieu complet MLTC. Au jour 15, l'activité cytotoxique des TIL a été testée contre les lignées cellulaires RCC-1 et K562 autologues, le phénotype de surface par immunofluorescence directe a été caractérisé et les cellules ont été clonées par la technique des dilutions limites. Les TIL ont été ensemencés à raison de 0,6 à 600 cellules/puits dans des plaques à 96 micropuits en forme de V (Nunc, Danemark), ensemencées au préalable avec des cellules tumorales autologues irradiées (1×10^4 /puits) servant de stimulateurs et des PBL allogéniques irradiés (8×10^4 /puits) et des cellules B transformées par EBV irradiées (2×10^4 /puits), servant de cellules nourricières, dans un volume total de 200 μ l de milieu complet MLTC. Tous les 3 jours, 60 μ l de surnageant a été retiré dans chaque puits, et remplacé par 60 μ l de milieu frais. La cytotoxicité des clones a été déterminée dans un essai de relargage du chrome standard de 4 h. Tous les 7-10 jours, des clones de CTL ont été re-stimulés avec la lignée de cellules nourricières allogéniques et la lignée de cellules tumorales autologues, comme décrit ci-dessus.

25 Essai de cytotoxicité

L'activité cytolytique des CTL a été déterminée dans un essai de relargage du ^{51}Cr standard comme décrit antérieurement (22). Des cellules cibles ont été marquées (lignées de cellules RCC, K562) pendant 1 h avec 50 μCi à 100 μCi de ^{51}Cr (Du Pont, NEN, Boston, MA) à 37°C, et 2×10^3 cellules ont été ensemencées dans des plaques à 96 micropuits dans 100 μ l de RPMI supplémenté avec 5 % de FCS. Des cellules effectrices ont été rajoutées dans les puits, à différents rapports E:T allant de 40:1 à 0,1:1. Pour l'inhibition de la lyse par des mAb, des cellules cibles ont été pré-

incubées pendant 2 h en présence d'une concentration saturante de mAb avant addition des cellules effectrices. Les plaques à 96 micropuits ont été incubées à 37°C pendant 4 h et la libération de ^{51}Cr a été déterminée dans les surnageants recueillis. Pour le blocage de la cytotoxicité ou la production de TNF, les mAb suivants ont été
5 utilisées : W6/32, un mAb pan-MHC de classe I, et B1.23.2 (ME1), un mAb spécifique de HLA-B/C.

Transfection de cellules COS-7 et criblage de produits de transfection

Des expériences de transfection ont été réalisées avec des cellules COS-7 en utilisant
10 la méthode au DEAE-dextrane-chloroquine (5, 7, 23). Trois jours avant la transfection, des cellules COS-7 ont étéensemencées dans des plaques à fond plat à 96 micropuits, à raison de 5×10^3 cellules/puits, dans 150 μl de RPMI contenant 20 % de FCS. Les expériences de transfection ont été effectuées en double dans deux plaques de micropuits différentes. Pour la transfection, le milieu a été jeté puis
15 remplacé par 30 μl de mélange de transfection contenant 35 μg de DEAE-dextrane (Sigma), 0,1 mM de chloroquine (Sigma), avec 100 ng d'ADN plasmidique représentant un groupe d'environ 200 clones recombinés provenant de la bibliothèque d'ADNc et 100 ng du plasmide HLA-B*0702 autologue. Les cellules COS-7 ont été incubées pendant 4 h à 37°C, puis le milieu a été retiré et les cellules ont été incubées
20 pendant 2 minutes dans un tampon PBS 1x contenant 10 % de solution de diméthylsulfoxyde. Les cellules ont été lavées une fois dans du tampon PBS 1x et on les a incubées avec du RPMI à 10 % de FCS pendant 2 jours. Au bout de 2 jours, l'aptitude des cellules COS-7 transfectées à stimuler la production de TNF par le clone 3B8 a été testée, comme déterminé par l'essai WEHI.

25 L'aptitude des cellules COS-7 transfectées à stimuler la production de TNF a été testées (24). 2×10^3 CTL (clone 3B8) ont été rajoutée à des plaques à fond plat à 96 micropuits contenant des cellules COS-7 transfectées de façon transitoire dans 100 μl de RPMI à 10 % de FCS. Après 18 h, chaque surnageant a été recueilli et sa teneur
30 en TNF a été déterminé en testant son effet cytotoxique sur des cellules de clone 13 de WEHI-164 (25) dans un dosage colorimétrique au bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol]-2,5-diphényl-tétrazolium (MTT).

Analyse de taille de CDR3

L'analyse de taille de CDR3 de segments de gène TCRBV exprimés par le clone 3B8 de CTL ou se trouvant dans le sang ou des fragments de tumeur a été effectuée comme décrit précédemment (22). Le mode opératoire utilisé pour l'analyse de taille de CDR3 comprend des amplifications RT-PCR indépendantes de fragments TCRBV-BC (26), suivies d'un écoulement des produits PCR utilisant des amorces nidifiées fluorescentes TCRBC ou TCRBJ (27) et d'une détermination de taille de produits d'écoulement fluorescents par électrophorèse sur un séquenceur d'ADN automatisé ABI 373 (Applied Biosystems, Inc. Foster City, CA) utilisant le logiciel Immunoscope (28). Comme les positions d'amorce 5' et 3' sont fixes, des variations de taille des produits d'écoulement sont dues uniquement à des différences de longueur des régions CDR3. Chaque pic est caractérisé par sa position (taille de CDR3) et une intensité de fluorescence (unités de fluorescence arbitraires ou FU). Les graphiques représentant des motifs de taille de CDR3 ont été étalonnés à 100 % pour les pics les plus hauts. Dans du sang provenant de donneurs sains, la plupart des profils reflétant une diversité de tailles de CDR3 dans une sous-famille V β donnée affichaient 5 à 8 pics à intervalles de 3 nucléotides, avec une distribution presque gaussienne (21). Les pics dominants ont été définis comme étant des signaux de forte intensité, avec une diminution considérable dans les autres signaux de CDR3.

20

Construction de la bibliothèque d'ADNc

L'ARN poly(A)+ a été extrait à partir de la lignée cellulaire RCC-1 en utilisant une trousse Maxi Message Marker® (R&D systems Abingdon, GB) en suivant les instructions du fabricant. L'ADNc du premier brin a été synthétisé avec le système Superscript Choice System® (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) en utilisant une amorce oligo-dT contenant un site Not I à son extrémité 5', puis l'ADNc du deuxième brin a été synthétisé. Les ADNc ont été ligaturés en leur extrémité franche avec des adaptateurs semi-Bst XI (InVitrogen), puis digérée avec Not I et fractionnés par chromatographie sur colonnes de Sephacryl S-500 HR. Des fractions d'ADNc ont été sous-clonées dans les sites Bst XI et Not I du vecteur d'expression pcDNAI. Les plasmides recombinés ont été soumis à une électrophorèse dans E. coli MC1061/P3 et les bactéries ont été sélectionnées sur des plaques de gélose LB avec 50 μ g/ml

30

d'ampicilline et 10 µg/ml de tétracycline. Dans les expériences de criblage, la bibliothèque d'ADNc de RCC-1 a été divisée en 400 groupes de 200 clones d'ADNc. Chaque groupe de bactéries a été amplifié et l'ADN plasmidique a été extrait en utilisant la méthode de lyse alcaline (29).

5

Isolation de l'ADNc de iCE pleine longueur et d'ADNc de iCE mutés par mutation ponctuelle ou tronqués.

L'ARN total a été extrait à partir d'une lignée de cellules RCC par le mode opératoire de centrifugation à l'isothiocyanate de guanidine/chlorure de césium (30). Une transcription inverse a été effectuée sur 5 µg d'ARN total dans un volume réactionnel de 20 µl en utilisant la trousse cDNA Cycle® en suivant les instructions du fabricant. 1 µl du mélange réactionnel d'ADNc a été utilisé dans une réaction PCR utilisant de l'ADN polymérase de Taq (Perkin Elmer). Pour l'amplification d'ADNc de iCE humaine (31), les amorces suivantes ont été utilisées :

- 15 - Amorce P1, 5'-CCCAAGCTTGGTGAATAGCAGCGTGTCCGC-3' (nucléotides 28 à 48, sens, SEQ ID N°4).
- Amorce P2, 5'-TGCTCTAGAAGGGAGCTACAGCTCTGTGTG-3' (nucléotides 1666 à 1687, antisens, SEQ ID N°5).

- 20 Les conditions pour la PCR sont les suivantes : 10 min à 95°C suivies de 30 cycles d'amplification (94°C pendant 1 min, 60°C pendant 2 min, 72°C pendant 3 min avec une extension finale pendant 10 min à 72°C).

- 25 Le produit PCR ainsi obtenu est ensuite digéré par Hind III et Xba I et est sous-cloné dans les sites Hind III et Xba I du vecteur d'expression pcDNAI pour le séquençage. La séquence publiée de l'ADNc de iCE porte le numéro d'accès Y09616. Des mutants de iCE ont été obtenus par mutagenèse dirigée en codant la mutation ponctuelle souhaitée dans des amorces oligonucléotidiques en chevauchement et en générant les mutants par PCR (32). Le séquençage des produits PCR a été réalisé
30 avec une trousse de séquençage d'ADN ABI PRISM (PE Applied Biosystems).

Analyse par immunotransfert Northern (Northern blot)

L'ARN total a été extrait à partir de diverses tumeurs primaires en utilisant une technique de centrifugation à l'isothiocyanate de guanidinium/chlorure de césium (30). L'ARN poly(A+) a été préparé comme décrit ci-dessus à partir de lignées de cellules RCC et de lignées de cellules rénales non transformées. 5 µg d'ARN poly(A)+ ou 10 µg d'ARN total ont été soumis à une électrophorèse dans un gel de formaldéhyde à 1,2 % d'agarose et on les a transférés sur des membranes en nylon Hybond-N+ (Amersham, GB). L'ARN transféré a été hybridé à la fois avec un fragment d'ADNc 2C2 correspondant aux nucléotides 1033 à 2009 de la séquence d'ADNc de iCE humaine publiée (31) et avec un ADNc de glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) servant de sondes. Toutes les sondes ont été marquées avec de l'alpha[32P]dCTP (3000 Ci mmol-1) en utilisant la trousse de marquage d'amorce aléatoire Prime-IT™ II (Stratagene, La Jolla, CA). L'hybridation a été effectuée à 48°C pendant 16 heures.

Les membranes ont été lavées deux fois avec 2 x SSC à 52°C, une fois pendant 15 minutes avec 0,2 SSC/0,1 % SDS, et ensuite on les a autoradiographiées ou analysées avec un dispositif Phosphor-Imager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, Californie, USA).

Exemple 2 : Un clone de CTL spécifiques de RCC a été isolé à partir des TIL.

Des TIL provenant du patient 1 ont été stimulées avec des cellules tumorales autologues irradiées en présence d'une faible dose de IL-2 et de TCGF (22). Après 15 jours de MLTC, une activité cytolytique spécifique contre les cellules tumorales autologues (31 % de lyse à un rapport E:T de 40/1) a été détectée et des TIL ont été clonés par la technique des dilutions limites en présence de cellules tumorales autologues, de cellules B transformées par EBV, de PBL allogéniques, avec addition de IL-2 et de TCGF. Un clone TCRα/β⁺ CF8⁺, appelé 3B8, a été isolé. Il lyse la lignée de cellules RCC autologues mais pas les cellules cibles K562 sensibles à la NK. La cytotoxicité du clone 3B8 contre la lignée cellulaire RCC-1 autologue avec du mAb W6/32 a été bloquée (Figure 1A). Dans les essais tant de cytotoxicité (Figure 1B) que de production de TNF, toutes les lignées de cellules RCC HLA-B7⁺ allogéniques (RCC-2, RCC-4, RCC-5 sur la Figure 1B) et aucune des lignées de

cellules RCC HLA-B7- (RCC-7, RCC-6, RCC-7, RCC-8) sont reconnues par 3B8. Par conséquent, l'antigène reconnu par 3B8 est présenté par la molécule HLA-B7 et s'avère être couramment exprimé dans les lignées de cellules RCC. Les 6 molécules HLA de classe I ont été isolées à partir de RCC-1 par RT-PCR (33), clonées dans pcDNAI et ont été séquencées. La séquence nucléotidiques de l'ADNc de HLA-B7 autologue a permis d'identifier l'allèle impliqué comme étant HLA-B*0702. Une transfection de cet allèle HLA dans deux lignées de cellules RCC allogéniques HLA-B7⁺ s'avère suffisante pour induire une reconnaissance (sécrétion de TNF) par le clone 3B8 de CTL, confirmant le fait que ce clone a conduit à l'identification d'un antigène partagé qui est exprimé par toutes les RCC.

Exemple 3 : Expansion clonale in situ d'une sous-population de TIL avec des longueurs similaires de CDR3 TCRVB-BC et TCRVB-BJ que le clone 3B8 de CTL spécifiques de RCC

Pour le clone 3B8, un signal a été obtenu avec une seule des 24 amorces de sous-famille V β (TCRVB5) et une seule des 13 amorces TCRBJ (TCRBJ1S2) testées. L'analyse de distribution de taille de CDR3 a montré que le clonotype TCRBV5J1S2 de 3B8 est dominant dans la tumeur (comme indiqué par les amorces TCRBV5-BC sur la Figure 2A et par les amorces TCRBV5-BJ12 pour une analyse plus affinée sur la Figure 2B), tandis qu'un tel clonotype n'était pas trouvé dans les PBMC (une distribution de longueur de CDR3 pratiquement gaussienne avec les amorces TCRBV-BC, voir Figure 2A). Ce résultat suggère fortement que le clone 3B8 est entré en expansion spécifiquement sur le site de la tumeur, comme montré antérieurement par un séquençage d'ADNc dans plusieurs cas (14, 34-36).

Exemple 4 : Identification d'un ADNc codant pour l'antigène

Une bibliothèque d'ADNc a été construite dans le vecteur d'expression pcDNAI provenant d'ARN extrait à partir de la lignée cellulaire RCC-1. Cette bibliothèque d'ADNc a été divisée en 400 groupes de 200 plasmides recombinés, et chaque groupe a été co-transfecté en double dans des cellules COS-7 avec le vecteur d'expression pcDNAI contenant l'ADNc codant pour le HLA-B*0702 autologue. L'aptitude des

cellules COS-7 à stimuler la production de TNF par 3B8 a été testée. Au bout de 48 heures, les cellules COS-7 co-transfectées ont été incubées pendant 24 heures avec 3B8 et mesuré la concentration de TNF a été mesurée dans les surnageants de culture par son effet cytotoxique sur des cellules WEHI. Les quantités de TNF trouvées dans les surnageants vont de 8 à 11 pg/ml sauf pour deux paires de doublons plus importants (14 et 15 pg/ml). Pour chaque groupe de bactéries correspondant à ces puits candidats, l'ADN plasmidique a été extrait et sous-cloné. Un deuxième criblage en transfectant des cellules COS-7 avec 50 groupes de 50 plasmides recombinés extraits à partir de doublons positifs a été réalisé. Finalement, un troisième criblage dans des cellules COS-7 a conduit à l'isolation de 2 clones d'ADNc identiques (clones d'ADNc 2C2 et 3G7) qui transfèrent l'expression de l'antigène dans des cellules COS-7 HLA-B7⁺. Les résultats obtenus avec ces clones d'ADNc sont présentés sur la Figure 3A.

La séquence d'ADNc 2C2 a une longueur de 1250 nt et une homologie de 100 % sur les nt 763 à 2009 (les nt étant numérotés à partir du codon non-sens) d'un ADNc récemment identifié, codant pour une carboxyle estérase intestinale putative (31). Pour identifier l'ADNc de iCE de pleine longueur correspondant à la séquence publiée, une RT-PCR a été effectuée en partant d'ARN total extrait à partir d'une lignée de cellules RCC et le produit PCR de 1,6 kb correspondant a été sous-cloné dans le vecteur pcDNAI, puis séquencé. La séquence de nucléotides est identique à la séquence publiée de iCE. Des expériences de co-transfection dans des cellules COS-7 ont montré que l'ADNc de iCE de pleine longueur est capable de conférer une reconnaissance par 3B8.

25

Exemple 5 : Identification du peptide antigénique

Afin de délimiter la région nucléotidique minimale codant pour le peptide antigénique, on a obtenu divers ADNc tronqués, correspondant à la région codante de iCE, à partir du clone 2C2 d'ADNc (Figure 4). On a transfecté dans des cellules COS-7 ces fragments d'ADNc sous-clonés dans le vecteur d'expression pcDNAI, conjointement avec le pcDNAI contenant l'ADNc de HLA-B*0702 autologue. Une région codante nucléotidique minimale est située entre les nucléotides 763 et 1033.

Pour réduire la séquence nucléotidique codant pour l'antigène, plusieurs ADNc tronqués ont été obtenus par amplification PCR. Ces ADNc tronqués ont été co-transfectés avec l'allèle HLA-B*0702 dans des cellules COS-7. Les cellules COS-7 transfectées avec un fragment allant des nucléotides 763 à 855 sont reconnues par le 3B8 de CTL mais pas celles transfectées par un fragment allant des nucléotides 763 à 834 (Figure 4), indiquant que la région codante peptidique était située entre les nucléotides 763 et 855. Après examen de la séquence d'acides aminés correspondante, tous les nonamères et décamères possibles ont été synthétisés et leur aptitude à rendre des cellules B transformées par EBV autologues sensibles à une lyse par 3B8 a été évaluée. Aucun d'entre eux ne s'est avéré être positif à 10^{-4} ou 10^{-5} M.

Finalement, une ORF alternative a été trouvée (une phase ouverte de lecture traductionnelle +1 conduisant à une ORF de 453 nt) avec trois ATG sur les positions nt 476, 479 et 803, qui code un nonamère (SPRWWPTCL) dans la région minimale des nt 763-855. Cette séquence nonamère comprend des résidus d'ancrage de HLA-B7 sur les positions 2, 3 et 9. Une lyse semi-maximale de cellules B transformées par EBV était obtenue avec moins de 10^{-6} M de ce nonapeptide (Figure 5).

20 **Exemple 6 : Fixation du peptide de iCE à HLA-B7**

Des antigènes peptidiques de fixation à HLA-A2 régulent vers le haut l'expression de molécules HLA-A2 sur des cellules T2 (37). De façon similaire, des cellules T2 transfectées par HLA-B*0702 (38) ont été utilisées pour analyser la capacité de fixation et la stabilité du peptide de iCE (Figure 6). La fixation du peptide de iCE est stable dans le temps à 50 mM pendant au moins 4 h, contrairement au témoin, le peptide HSP70 à restriction HLA-A2 (14).

Exemple 7 : Distribution tissulaire d'ARNm de iCE

30 Pour déterminer la détermination tissulaire de messagers de iCE, un Master blot™ d'ARN humain (Clontech, Palo Alto, USA), constitué d'une membrane en nylon sur laquelle des ARN poly(A)+ provenant de 50 tissus humains ont été immobilisés en taches séparées, a été hybridés avec l'ADNc marqué au ^{32}P du clone 2C2, servant de

sonde. L'ARNm de iCE a été détecté dans le foie, le rein, l'intestin grêle, le colon et le cœur, et il était faiblement exprimé dans l'hypophyse, la surrénale, la prostate et l'estomac. Aucun signal n'a été trouvé dans les tissus fœtaux, dans la moelle osseuse, dans les leucocytes périphériques, dans le poumon et dans le cerveau. Pour identifier les espèces d'ARNm, un Northern blot a été préparé avec de l'ARN poly(A)+ provenant de diverses lignées de cellules RCC et lignées de cellules rénales non transformées (Figure 7A), ainsi qu'avec de l'ARN total extrait à partir de diverses tumeurs primaires, à savoir des tumeurs rénales, un mélanome, une tumeur de la vessie, un neuroblastome, une tumeur du côlon (Figure 7B). Le blot d'ARN a été hybridé avec une sonde d'ADNc correspondant aux nucléotides 1033-2009 de la séquence de 2C2. Comme le montre la Figure 7A, deux espèces d'ARNm (4,5 kb, 3,5 kb) antérieurement décrites par Schwer et al. (31), ont été détectées dans des lignées de cellules de carcinome RCC ainsi que dans des cellules rénales non transformées. Dans les tumeurs primaires rénales, un produit de transcription d'ARNm unique (3,5 kb) est détectable, tandis qu'aucun produit de transcription de iCE n'a été détecté dans des tumeurs primaires d'histotypes différents (Figure 7B). Bien qu'un produit de transcription additionnel de 2,2 kb ait été indiqué (31) dans l'intestin grêle et le foie, aucun tel produit de transcription n'a été détecté dans les diverses lignées cellulaires ou tumeurs primaires testées. Ainsi, la protéine de iCE est codée dans les tumeurs RCC à partir d'une espèce d'ARNm unique exprimé de façon prédominante (3,5 kb).

Exemple 8 : Un codon non-AUG cryptique initie une phase ouverte de lecture alternative

Un codon de terminaison a d'abord été introduit en position 807 de l'ADNc de iCE de pleine longueur (Figure 8A) juste avant la séquence codante nonamère pour confirmer que le peptide reconnu dans les essais de cytotoxicité est codé par la séquence correspondante dans des essais de transfection de COS-7. Cette mutation ponctuelle (mutant A) abolit la reconnaissance de 3B8 de CTL après co-transfection avec HLA-B*0702 dans des cellules COS (8B). Le site d'initiation de traduction AUG naturel a été muté en position 3 et ce mutant ponctuel (mutant B) s'avère être encore reconnu (Figure 8), indiquant que ni la séquence en acide aminé de iCE

naturelle ni une séquence chimère résultant d'un décalage de phase traductionnel programmé (c'est-à-dire d'un glissement dans iCE du ribosome d'un codon vers l'avant) et d'un recodage de la séquence en aval (39, 40) ne code le peptide reconnu.

- 5 En plus du décalage de phase ribosomal (41), un mécanisme de balayage ribosomal qui initie la traduction au niveau d'un ATG en aval s'est avéré conduire à la production de phases de lecture alternatives reconnues par des cellules T (42). Des mutations ponctuelles sur l'ADNc de iCE de pleine longueur ont été introduites au niveau de chacun des trois sites ATG trouvés dans la ORF +1 en amont du peptide
- 10 nonamère (mutant C pour les positions 476 et 479 et mutant D en position 803) pour tester si les hybrides pcDNAI de iCE mutés correspondants étaient toujours capables de conférer une reconnaissance par 3B8 de CTL dans des essais de libération de TNF quand ils étaient co-transfectés avec HLA-B*0702 dans des cellules COS. Comme le montre la Figure 8B, aucune de ces mutations n'abolit la reconnaissance par 3B8 de
- 15 CTL. Ces résultats démontrent qu'un codon non-AUG cryptique est utilisé dans l'ADNc de iCE en tant que site d'initiation de traduction alternatif.

- Pour délimiter la région nucléotidique minimale codant pour ce codon non-ATG cryptique, des codons de terminaisons devant interrompre la ORF +1 ont été
- 20 introduits en différentes positions en amont du peptide antigénique (entre les positions 428 et 809), avec des mutations ponctuelles sur les positions 466 (mutant E), 519, 666 et 786 de l'ADNc de iCE de pleine longueur (Figure 8A). Ces quatre mutants abolissent tous la reconnaissance de 3B8 de CTL après co-transfection (voir sur la Figure 8B le résultat du mutant E pour la position 446). Une région
- 25 nucléotidique minimale a ensuite été localisée entre les nt 428 et 466. Des codons non-ATG possibles ont ensuite été recherchés (CTG, ACG) dans cette séquence courte, et un codon ACG en position 440 a été trouvé. Une mutation de ce codon en ACT (mutant F) abolit la reconnaissance de 3B8 de CTL (Figure 8B). Ainsi, le premier codon non-AUG dans la ORF +1 a été utilisé pour initier le processus de
- 30 traduction.

REFERENCES

1. Van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. D. Plaen, B. V. d. Eynde, A. Knuth, and T. Boon. 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. Science 254:1643.
2. Van den Eynde, B. , and V. G. Brichard. 1995. New tumor antigens recognized by T cells. Curr. Opin. Immunol. 7:674.
3. Gaugler, B., B. V. d. Eynde, P. Van den Bruggen, P. Romero, J. J. Gaforio, E. D. Plaen, B. Lethe, F. Brasseur, and T. Boon. 1994. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. J. Exp. Med. 179:921.
4. Boel, P., C. Wildmann, M. L. Sensi, R. Brasseur, J. C. Renauld, P. Coulie, T. Boon, and P. Van den Bruggen. 1995. BAGE : a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. Immunity 2:167.
5. Coulie, P. G., V. Brichard, A. V. Pel, T. Wölfel, J. Schneider, C. Traversari, S. Mattei, E. D. Plaen, C. Lurquin, J. P. Szikora, J. C. Renauld, and T. Boon. 1994. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. J. Exp. Med. 180:35.
6. Kawakami, Y., S. Eliyahu, K. Sakaguchi, P. F. Robbins, L. Rivoltini, J. R. Yannelli, E. Appella, and S. A. Rosenberg. 1994. Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. J. Exp. Med. 180:347.

7. Brichard, V., A. V. Pel, T. Wölfel, C. Wölfel, E. D. Plaen, B. Lethé, P. Coulie, and T. Boon. 1993. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* 178:489.
- 5 8. Robbins, P. F., M.El-Gamil, Y. F. Li, S. L. Topalian, L. Rivoltini, K. Sakaguchi, E. Appella, Y. Kawakami, and S. A. Rosenberg. 1995. Cloning of a new gene encoding an antigen recognized by melanoma-specific HLA-A24-restricted tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Immunol.* 154:5944.
- 10 9. Wang, R. F., P. F. Robbins, Y. Kawakami, X. Q. Kang, and S. A. Rosenberg. 1995. Identification of a gene encoding a melanoma tumor antigen recognized by HLA-A31-restricted tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* 181:799.
- 15 10. Robbins, P. F., M. El-Gamil, Y. F. Li, Y. Kawakami, D. Loftus, E. Appella, and S. A. Rosenberg. 1996. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* 183:1185.
- 20 11. Coulie, P. G., F. Lehmann, B. Lethé, J. Herman, C. Lurquin, M. Andrawiss, and T. Boon. 1995. A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7976.
- 25 12. Wölfel, T., M. Hauer, J. Schneider, M. Serrano, C. Wolfel, E. Klehmann-Hieb, E. D. Plaen, T. Hankeln, K. H. M. z. Buschenfelde, and D. Beach. 1995. A p16ink4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269:1281.
- 30 13. Brandle, D., F. Brasseur, P. Weynants, T. Boon, and B. J. V. d. Eynde. 1996. A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma. *J. Exp. Med.* 183:2501.

14. Gaudin, C., F. Kremer, E. Angevin, V. Scott, and F. Triebel. 1999. A HSP70-2 mutaton recognized by cytolytic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma. *J. Immunol.* 162:1730.
- 5
15. Guilloux, Y., S. Lucas, V. G. Brichard, A. VanPel, C. Viret, E. D. Plaen, F. Brasseur, B. Lethe, F. Jotereau, and T. Boon. 1996. A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanoma is encoded by an intron sequence of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene. *J. Exp. Med.* 183:1173.
- 10
16. Robbins, P. F., M. El-Gamil, Y. F. Li, E. B. Fitzgerald, Y. Kawakami, and S. A. Rosenberg. 1997. The intronic region of an incompletely spliced gp100 gene transcript encodes an epitope recognized by melanoma-reactive tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Immunol.* 159:303.
- 15
17. Wang, R. F., E. Appella, Y. Kawakami, X. Kang, and S. A. Rosenberg. 1996. Identification of TRP-2 as a human tumor antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 184:2207.
- 20
18. Wang, R. F., S. L. Johnston, G. Zeng, S. L. Topalian, D. J. Schwartzentruber, and S. A. Rosenberg. 1998. A breast and melanoma-shared tumor antigen: T cell responses to antigenic peptides translated from different open reading frames. *J Immunol* 161:3598.
- 25
19. Nanbru, C., I. Lafon, S. Audigier, M. C. Gensac, S. Vagner, G. Huez, and A. C. Prats. 1997. Alternative translation of the proto-oncogene c-myc by an internal ribosome entry site. *J. Biol. Chem.* 272:32061.
- 30
20. Vagner, S., C. Touriol, B. Galy, S. Audigier, M. C. Gensac, F. Almaric, F. Bayard, H. Prats, and A. C. Prats. 1996. Translation of CUG- but not AUG-

initiated forms of human fibroblast growth factor 2 is activated in transformed and stressed cells. *J. Cell. Biol.* 135:1391.

21. Galy, B., A. Maret, A. C. Prats, and H. Prats. 1999. Cell transformation results in the loss of the density-dependent translational regulation of the expression of fibroblast growth factor 2 isoforms. *Cancer Res.* 59:165.
22. Angevin, E., F. Kremer, C. Gaudin, T. Hercend, and F. Triebel. 1997. Analysis of T-cell immune response in renal cell carcinoma: polarization to type 1-like differentiation pattern, clonal T cell expansion and tumor-specific cytotoxicity. *Int. J. Cancer* 72:431.
23. Seed, B. 1987. An LFA-3 cDNA encodes a phospholipid-linked membrane protein homologous to its receptor CD2. *Nature* 329:840.
24. Traversari, C., P. Van der Bruggen, I. F. Luescher, C. Lurquin, P. Chomez, A. Van Pel, E. De Plaen, A. Amar-Costesec, and T. Boon. 1992. A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J. Exp. Med* 176:1453.
25. Espevik, T., and J. Nissen-Meyer. 1986. A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J. Immunol. Methods* 95:99.
26. Genevee, C., A. Diu, J. Nierat, A. Caignard, P. Y. Dietrich, L. Ferradini, S. Roman-Roman, F. Triebel, and T. Hercend. 1992. An experimentally validated panel of subfamily-specific oligonucleotide primers (V α 1-w29/V α 1-w24) for the study of human T cell receptor variable V gene segment usage by polymerase chain reaction. *Eur. J. Immunol* 22:1261.
27. Even, J., A. Lim, I. Puisieux, L. Ferradini, P. Y. Dietrich, A. Toubert, T. Hercend, F. Triebel, C. Pannetier, and P. Kourilsky. 1995. T-cell repertoires in

healthy and diseased human tissues analysed by T-cell receptor α -chain CDR3 size determination : evidence for oligoclonal expansions in tumours and inflammatory diseases. *Res. Immunol.* 146:65.

- 5 28. Pannetier, C., M. Cochet, S. Darche, A. Casrouge, M. Zoller, and P. Kourilsky. 1993. The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor α chains vary as a function of the recombined germ-line segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2472.
- 10 29. Birnboim, H. C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res* 7:1513.
- 15 30. Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 20 31. Schwer, H., T. Langmann, R. Daig, A. Becker, C. Aslanidis, and G. Schmitz. 1997. Molecular cloning and characterization of a novel putative carboxylesterase, present in human intestine and liver. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 233:117.
- 25 32. Mikaelian, I., and A. Sergeant. 1992. A general and fast method to generate multiple site directed mutations. *Nuc. Ac. Res.* 20:376.
- 30 33. Ennis, P. D., J. Zemmour, R. D. Salter, and P. Parham. 1990. Rapid cloning of HLA-A,B cDNA by using the polymerase chain reaction: Frequency and nature of errors produced in amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 87:2833.
34. Farace, F., F. Orlanducci, P. Y. Dietrich, C. Gaudin, E. Angevin, M. H. Courtier, C. Bayle, T. Hercend, and F. Triebel. 1994. T cell repertoire in

patients with B-chronic lymphocytic leukemia : evidence for multiple in vivo T cell clonal expansions. *J. Immunol.* 153:4281.

- 5 35. Farace, F., E. Angevin, I. Poullion, C. Leboullaire, G. Ferir, D. Elias, B. Escudier, and F. Triebel. 1997. T-cell receptor CDR3 size distribution analysis to evaluate specific T-cell response to cancer vaccines. *Int. J. Cancer* 71:972.
- 10 36. Gaudin, C., P. Y. Dietrich, S. Robache, M. Guillard, B. Escudier, M. J. Terrier-Lacombe, A. Kumar, F. Triebel, and A. Caignard. 1995. In vivo local expansion of clonal T cell subpopulations in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 55:685.
- 15 37. Nijman, H. W., J. G. Houbiers, M. P. Vierboom, S. H. v. d. Burg, J. W. Drijfhout, J. D'Amato, P. Kenemans, C. J. Melief, and W. M. Kast. 1993. Identification of peptide sequences that potentially trigger HLA-A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 23:1215.
- 20 38. Smith, K. D., and C. T. Lutz. 1996. Peptide-dependent expression of HLA-B7 on antigen processing deficient T2 cells. *J. Immunol.* 156:3755.
39. Farabaugh, P. J. 1996. Programmed translational frameshifting. *Annu. Rev. Genet.* 30:507.
- 25 40. Matsufuji, S., T. Matsufuji, Y. Miyazaki, Y. Murakami, J. F. Atkins, R. F. Gesteland, and S. Hayashi. 1995. Autoregulatory frameshifting in decoding mammalian ornithine decarboxylase antizyme. *Cell* 80:51.
- 30 41. Elliott, T., H. Bodmer, and A. Townsend. 1996. Recognition of out-of-frame major histocompatibility complex class I-restricted epitopes in vivo. *Eur J Immunol* 26:1175.

42. Bullock, T. N. J., and L. C. Eisenlohr. 1996. Ribosomal scanning past the primary initiation codon as a mechanism for expression of CTL epitopes encoded in alternative reading frames. *J. Exp. Med.* 184:1319.

REVENDICATIONS

1. Composé peptidique caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'au moins 8 acides aminés consécutifs de la séquence SEQ ID N°1, et ce qu'il entraîne une
5 réponse T spécifique.
2. Composé peptidique selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend une séquence ayant au moins 80 % d'identité avec la séquence SPRWWPTCL (SEQ ID N°2).
10
3. Composé peptidique selon l'une des revendications 1 et 2 caractérisé en ce qu'il comporte au moins un élément différent des acides aminés naturels.
4. Procédé d'identification de composés peptidiques comprenant une séquence
15 ayant au moins 80% d'identité avec une séquence d'environ 9 à 10 acides aminés consécutifs de la séquence SEQ ID N°1 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
 - a) détermination de fragments possédant une séquence d'environ 9 à 10 acides aminés comportant un motif d'ancrage pour une molécule HLA donnée,
 - 20 b) détermination de l'immunogénicité des fragments peptidiques obtenus à l'étape a), de préférence en effectuant un test Elispot.
5. Composé peptidique susceptible d'être obtenu à partir d'un procédé selon la
25 revendication 4.
6. Procédé de mise en évidence de mutations ou d'altérations ponctuelles artificielles susceptibles d'augmenter l'immunogénicité des composés peptidiques selon l'une des revendications 1 à 3 et 5 caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
 - 30 a) Détermination de fragments possédant une séquence d'environ 9 à 10 acides aminés comportant un motif d'ancrage pour une molécule HLA donnée,

- b) introduction d'une mutation ou d'une altération (par exemple une modification post traductionnelle) ponctuelle supplémentaire au niveau des résidus 4, 5, 6, 7 ou 8,
- c) détermination de l'immunogénicité des fragments peptidiques obtenus à l'étape b), de préférence en effectuant un test Elispot.
- 5
7. Composé peptidique susceptible d'être obtenu à partir d'un procédé selon la revendication 6 caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'environ 9 à 10 acides aminés de la séquence SEQ ID N°1 présentant au moins une mutation ou
- 10 une altération par rapport à la séquence SEQ ID N°1, et ce qu'il entraîne une réponse T spécifique.
8. Composé peptidique selon la revendication 7 caractérisé en ce qu'il dérive de la séquence SPRWWPTCL (SEQ ID N°2).
- 15
9. Fragment d'ADN codant au moins pour un fragment peptidique de l'une des revendications 1 à 3, 5, 7 et 8.
10. Fragment d'ADN selon la revendication 9 caractérisé en qu'il comprend une séquence ayant au moins 50% d'identité avec une séquence d'au moins 24 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°3.
- 20
11. Vecteur d'expression d'un fragment peptidique selon l'une des 1 à 3, 5, 7 et 8 contenant un fragment d'ADN de la revendication 10 fusionné à un promoteur efficace dans les cellules eucaryotes, et/ou dans les cellules procaryotes, en particulier dans les cellules humaines.
- 25
12. Vecteur d'expression selon la revendication 11 comprenant en outre un ou plusieurs marqueur(s) de sélection et éventuellement une ou plusieurs

séquence(s) codante(s) pour des facteurs d'activation des défenses immunitaires, tels que des cytokines et/ou des lymphokines.

13. Vecteur selon l'une des revendications 11 et 12 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un
5 vecteur viral, d'un plasmide, ou d'un pseudo-vecteur.

14. Cellules dendritiques chargées en composés peptidiques selon l'une des revendications 1 à 3, 5, 7 et 8.

10 15. Cellules dendritiques transformées par le vecteur d'expression selon l'une des revendications 11 à 13.

16. Cellules dendritiques selon l'une des revendications 14 et 15 caractérisées en ce qu'elles font parties des macrophages.
15

17. Composition pharmaceutique comprenant un composé peptidique ou un mélange de composés peptidiques selon l'une des revendications 1 à 3, 5, 7 et 8 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

20 18. Composition pharmaceutique comprenant un vecteur d'expression selon l'une des revendications 11 à 13 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

19. Composition pharmaceutique comprenant notamment un fragment d'ADN selon la revendication 9 ou 10 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
25

20. Composition pharmaceutique comprenant les cellules selon l'une des revendications 14 à 16 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

21. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 17 à 20 caractérisée en ce qu'il comporte en outre un ou plusieurs adjuvants immunologiques, notamment des agents cytotoxiques des tumeurs.
- 5 22. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 17 à 21 caractérisée en qu'il comporte un véhicule pharmaceutique compatible avec une administration IV, subcutanée, orale, ou nasale.
- 10 23. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 17 à 22 caractérisée en ce qu'il comporte un véhicule pharmaceutique sélectionné parmi les liposomes, les nano-particules, ou les émulsions lipidiques, chargés positivement ou négativement.
- 15 24. Utilisation d'un composé peptidique selon l'une des revendications 1 à 3, 5, 7 et 8 pour la fabrication d'un médicament.
- 25 25. Utilisation d'un composé peptidique selon l'une des revendications 1 à 3, 5, 7 et 8 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du cancer.
- 20 26. Utilisation d'un composé peptidique selon l'une des revendications 1 à 3, 5, 7 et 8 pour la fabrication d'un médicament destiné à une immunisation ex vivo, consistant notamment à induire in vitro des CTL spécifiques de tumeurs, les expandre et les réinjectés, ladite induction pouvant être effectuée à l'aide de cellules dendritiques chargées.
- 25 27. Utilisation d'un composé peptidique selon l'une des revendications 1 à 3, 5, 7 et 8 pour la fabrication d'un médicament destiné à une immunisation in vivo.
- 30 28. Utilisation d'un composé peptidique selon l'une des revendications 1 à 3, 5, 7 et 8 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du cancer, en

particulier des tumeurs solides, notamment des carcinomes, des mélanomes, des neuroblastomes, de préférence des hépatocarcinomes et des adénocarcinomes du côlon ou du rein.

- 5 29. Utilisation d'un composé peptidique selon l'une des revendications 1 à 3, 5, 7 et 8 pour augmenter en milieu de culture la population des CTL des tumeurs et/ou induire la sécrétion par lesdits CTL de facteurs cytotoxiques tels que par exemple IL-2, IFN- γ et TNF.
- 10 30. Utilisation d'un composé peptidique selon l'une des revendications 1 à 3, 5, 7 et 8 pour la fabrication d'un médicament destiné à stimuler les défenses immunitaires, en particulier pour augmenter la population des CTL des tumeurs et/ou induire la sécrétion par lesdits CTL de facteurs cytotoxiques tels que par exemple IL-2, IFN- γ et TNF.
- 15 31. Procédé de production d'un anticorps reconnaissant un composé peptidique selon l'une des revendications 1 à 3, 5, 7 et 8 comprenant les étapes consistant à :
- 20 a) immuniser un mammifère avec ledit composé peptidique,
b) isoler un anticorps monoclonal qui se lie audit peptide dans un essai immunologique.
32. Anticorps monoclonal susceptible d'être obtenu à partir du procédé selon la revendication 31.
- 25 33. Procédé de détection d'un peptide ou polypeptide codé par l'ORF+1 de iCE, comprenant les étapes consistant à :
- a) mettre en contact un échantillon prélevé chez un individu avec un anticorps monoclonal selon la revendication 32,
b) permettre la formation du complexe anticorps-peptide ou polypeptide,

c) détecter ledit peptide ou polypeptide au moyen d'un marqueur détectable dans le complexe ou qui se lie au complexe.

5 34. Trousse de diagnostic comportant notamment un anticorps selon la revendication 32 pour la détection du cancer.

35. Trousse de diagnostic comportant notamment un anticorps selon la revendication 32 pour le pronostique du cancer déclaré chez un individu.

10 36. Composition pharmaceutique comprenant notamment un anticorps monoclonal selon la revendication 32 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

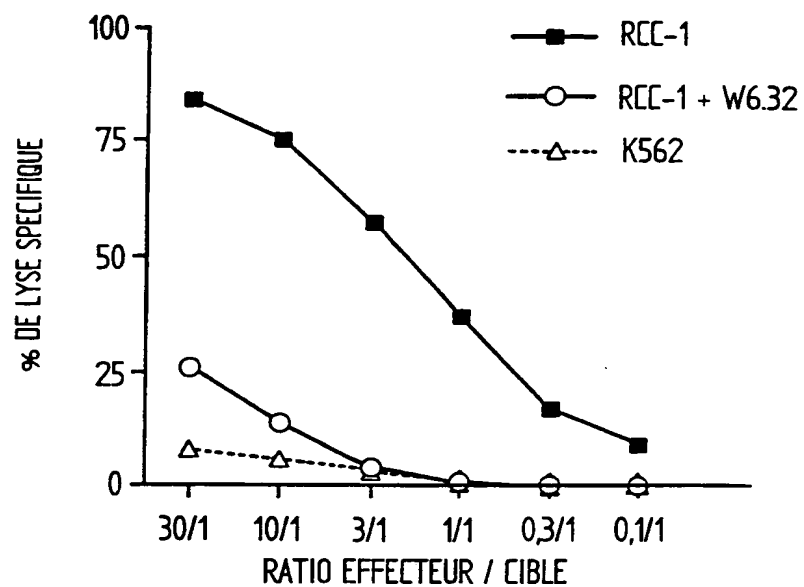
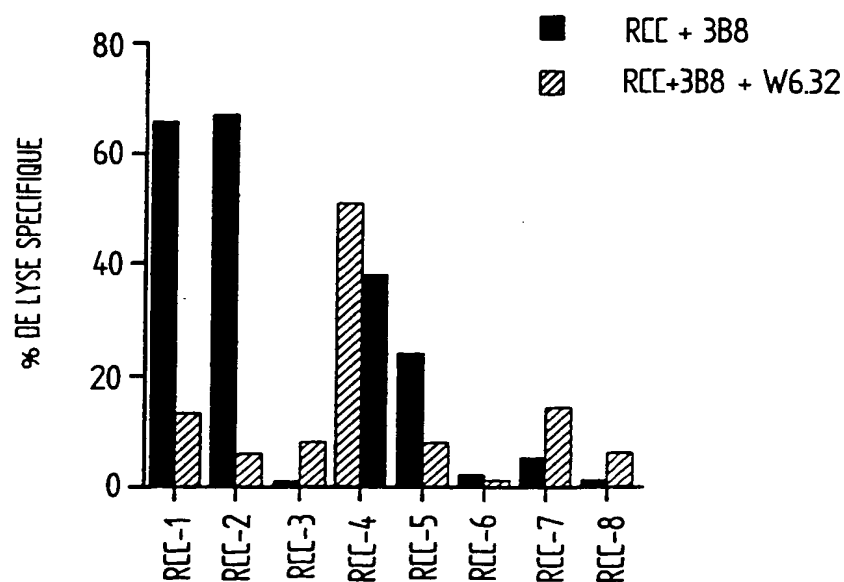
15

20

25

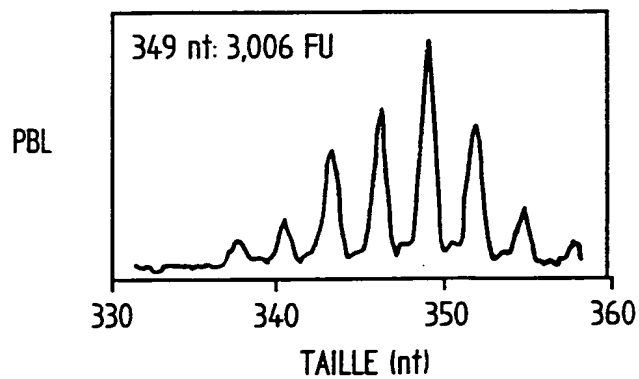
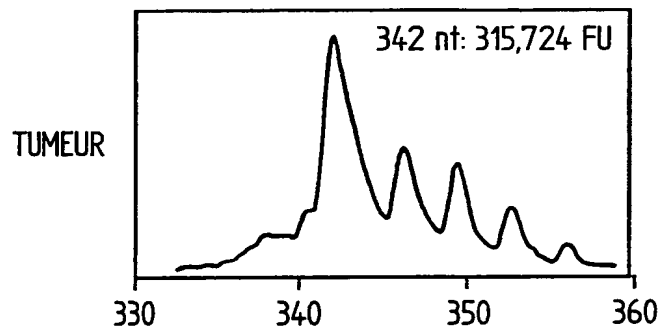
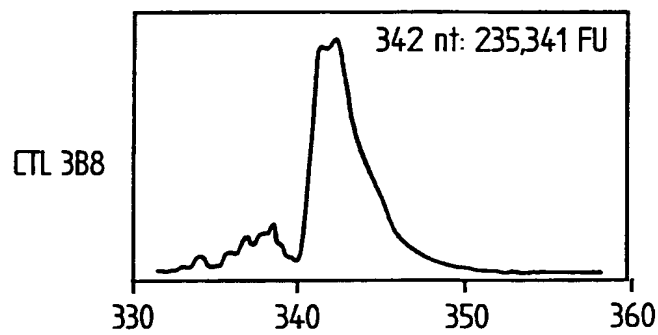
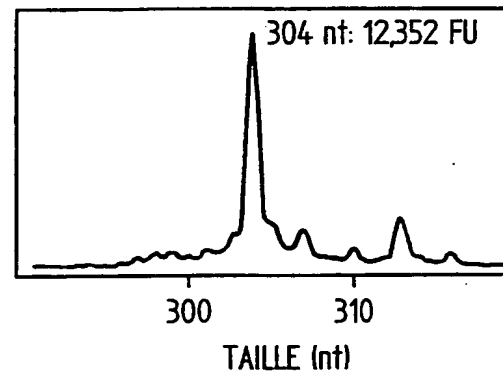
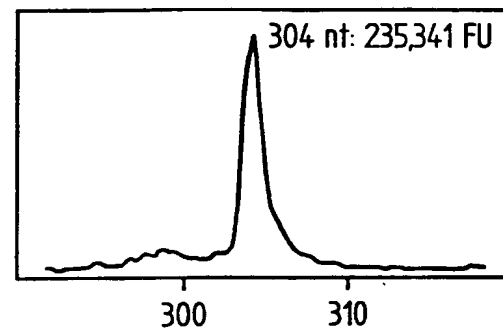
30

1 / 10

FIG.1AFIG.1B

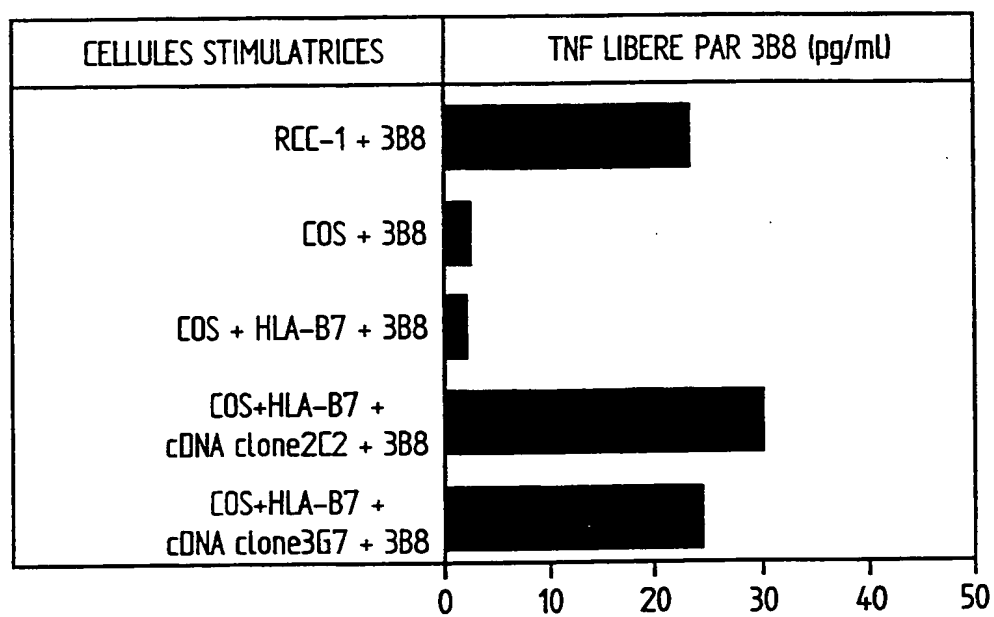
THIS PAGE BLANK (USPTO)

2 / 10

FIG. 2A*TCRBV5/BC*FIG. 2B*TCRBV5/BJ1S2*

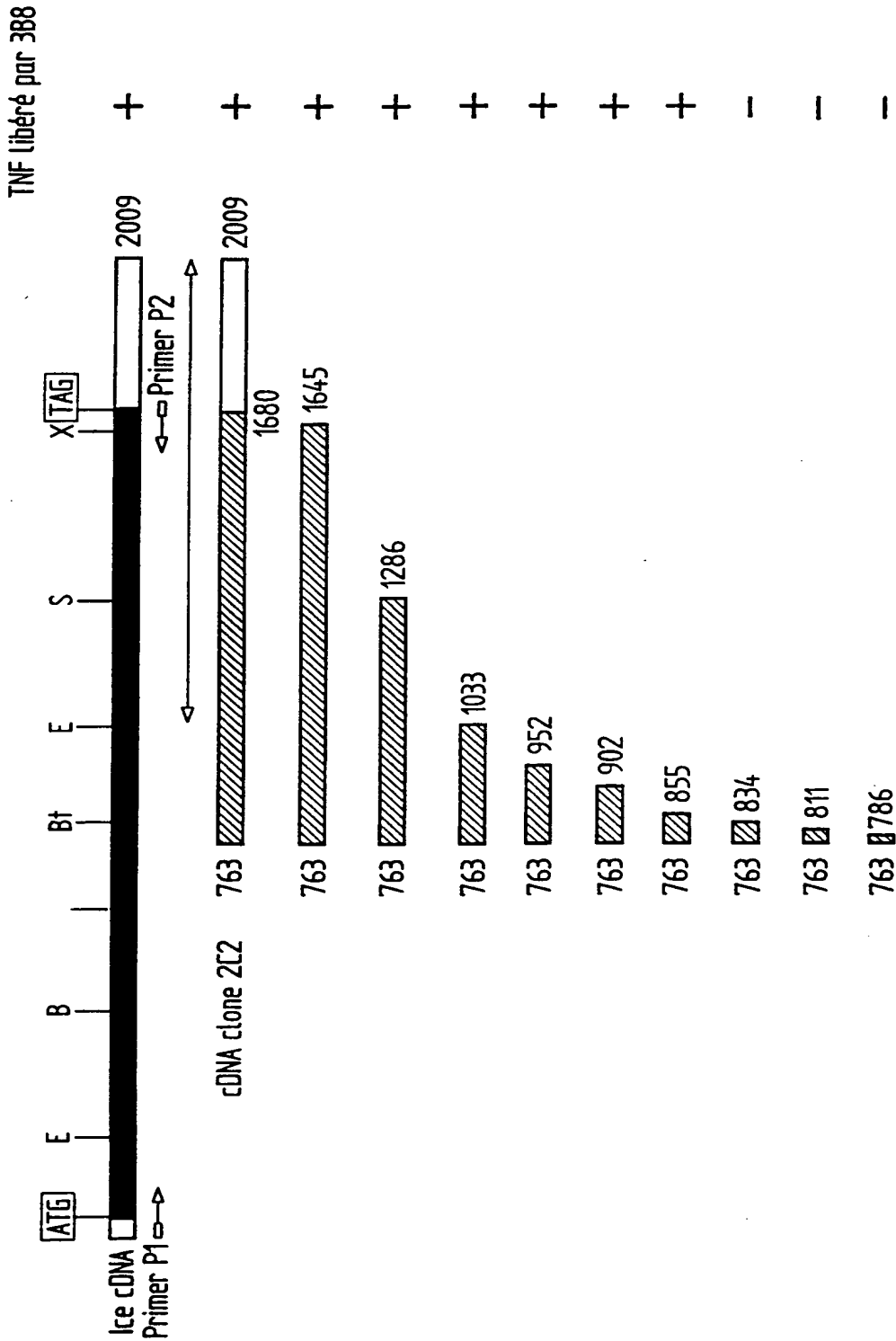
THIS PAGE BLANK (USPTO)

3 / 10

FIG. 3

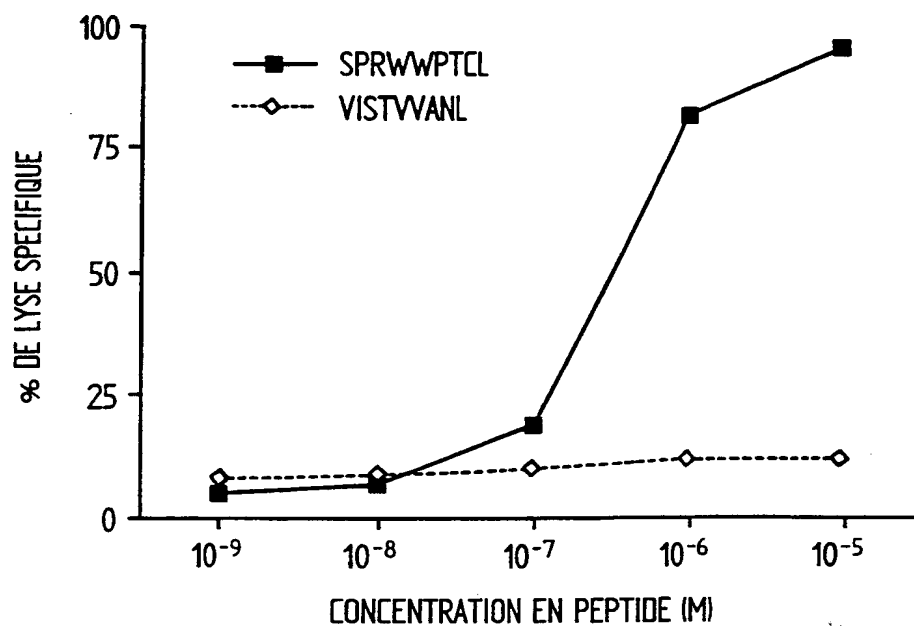
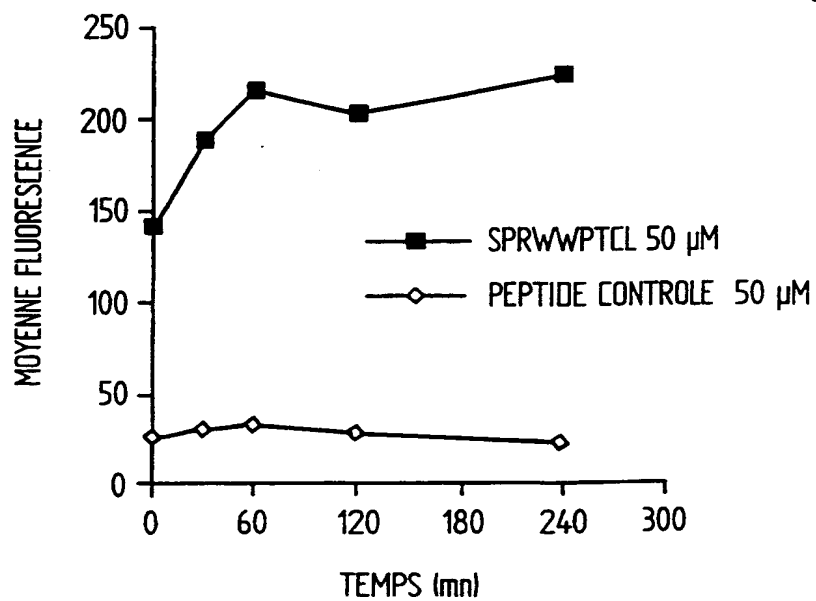
THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIG. 4

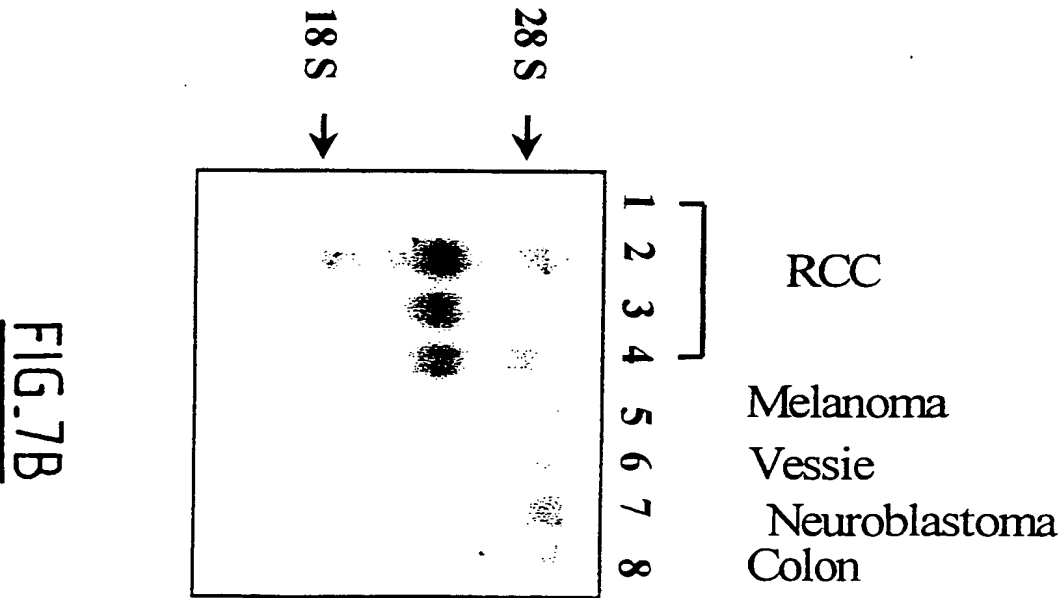
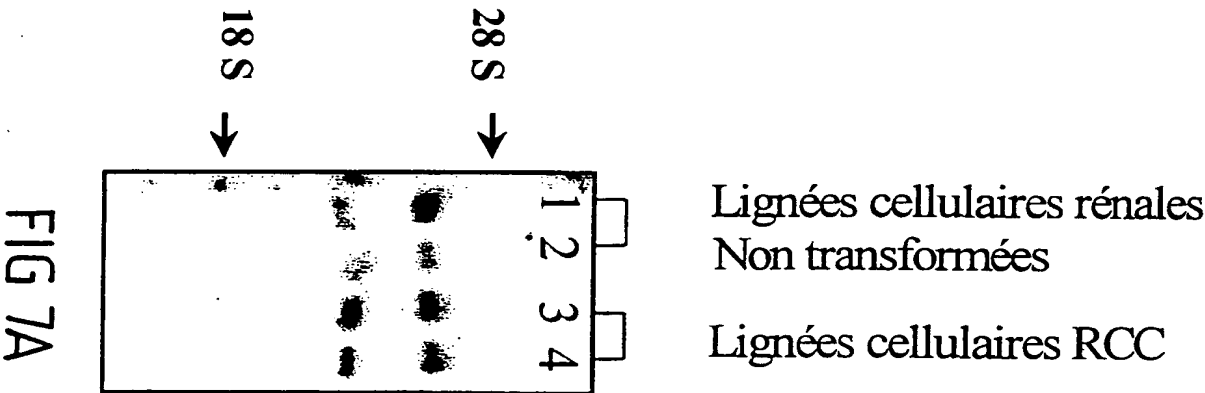


THIS PAGE BLANK (USPTO)

5 / 10

FIG. 5FIG. 6

THIS PAGE BLANK (USPTO)



THIS PAGE BLANK (USPTO)

7 / 10

FIGURE 8A

B atGcggtgcacagacttcgtgcggtgagcggtggcctgtggcttctgtgctt 60
M R L H R L R A R L S A V A C G L L L L
cttgccggggccaggactcagccagtcagtcaccgaccacacacacgggcag 120
L V R G Q G Q D S A S P I R T T H T G Q
gtgctgggagtcctgtccatgtgaaggcgccaatgccgggggtccaaaccttcctggga 180
V L G S L V H V K G A N A G V Q T F L G
attccatttgccaagccacctctaggtccgctgcgatttgcacccccctgagccccctgaa 240
I P F A K P P L G P L R F A P P E P P E
tcttgagtggtgagggatggaaccaccatccggccatgtgtctacaggacctcacc 300
S W S G V R D G T H P A M C L Q D L T
gcagtgagtcagagttcttagccagttcaacatgaccttccctccgactccatgtct 360
A V E S E F L S Q F N M T F P S D S M S
gaggactgcctgtacctcagcatctacacgcccgcctatagccatgaaggctctaacctg 420
E D C L Y L S I Y T P A H S H E G S N L

F ccggtgatggtgtggatccacGgtggtgcgcttgttttggcatgGcttccttgtAtgAt 480
P V M V W I H G G A L V F G M A S L Y D
- W C G S T V V R L F L A W L P C M M
ggttccatgctggtgccttggaacgtggtggtggtCatcatccagtagccctgggt 540
G S M L A A L E N V V V I I Q Y R L G
V P C W L P W R T W W S S S T A W V

C

THIS PAGE BLANK (USPTO)

8 / 10

FIGURE 8A (suite)

gtccctgggcttcttcagcactggagacaagcacgcaaccggcaactggggtacctggac 600
 V L G F F S T G D K H A T G N W G Y L D
 S W A S S A L E T S T Q P A T G A T W T
 caagtgggtgcactacgtgggtccagcagaatatcgccactttggaggcaaccctgac 660
 Q V A A L R W V Q Q N I A H F G G N P D
 K W L H Y A G S S R I S P T L E A T L T
 cgtgtCaccatttttggcgagtctgcgggtggcacgagtgtgtcttcgcttgtgtgtcc 720
 R V T I F G E S A G G T S V S S L V V S
 V S P F L A S L R V A R V C L R L L C P
 cccatatcccaaggactcttccacggagccatcatggagagtggcgtggccctcctgcc 780
 P I S Q G L F H G A I M E S G V A L L P
 P Y P K D S S T E P S W R V A W P S C P
 D A
 ggccctCattgccagctcagctgAtgtCatctccacgggtgggtggccaacctgtcctgt 840
 G L I A S S A D V I S T V V A N L S A C
 A S L P A Q L M S S P R W W P T C L P V
 gaccaagtgtgactctgagggccctgggtgggtgcctgcgggggcaagagtaaagagagatt 900
 D Q V D S E A L V G C L R G K S K E E I
 T K L T L R P W W A A C G A R V K R R F
 cttgcaattaacaagcctttcaagatgatccccggagtggtggatggggtcttcctgcc 960
 L A I N K P F K M I P G V V D G V F L P
 L Q L T S L S R -
 aggcacccccaggagctgtggcctctgcgcgactttcagcctgtccctagcattgttggt 1020
 R H P Q E L L A S A D F Q P V P S I V G

THIS PAGE BLANK (USPTO)

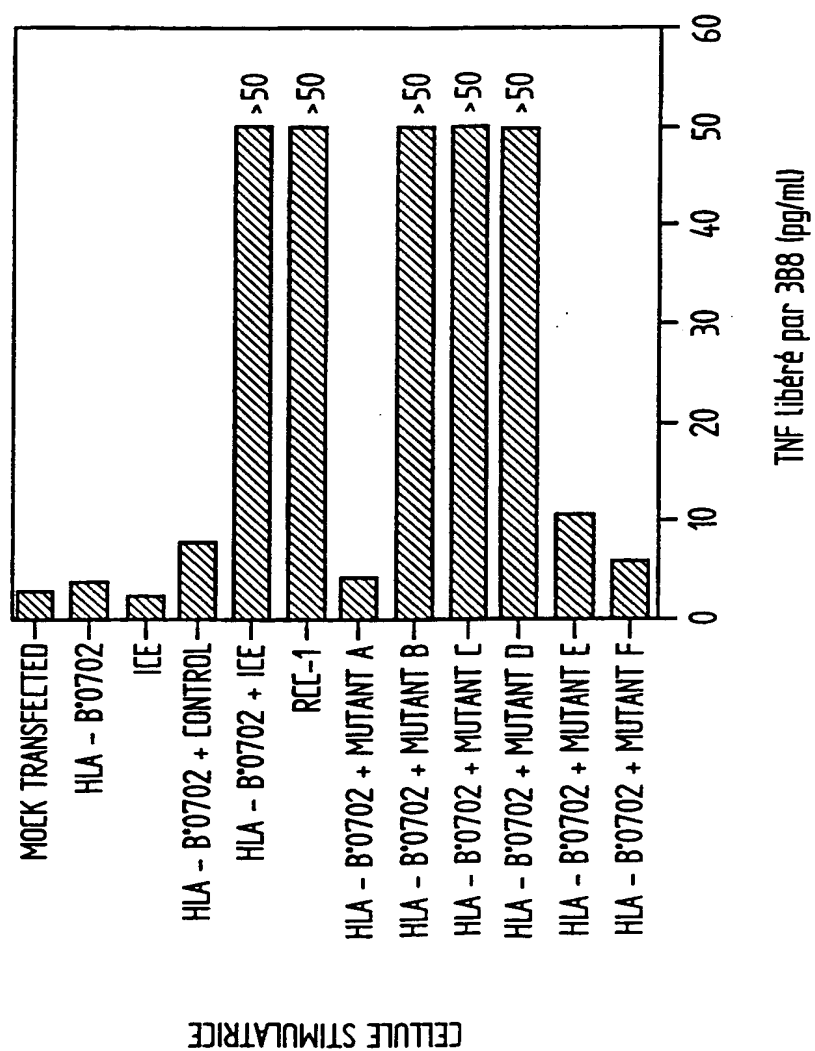
FIGURE 8A (suite)

gtcaacaacaatgaattcggctggctcatcccccaaggctcatgaggatctatgatataccag 1081
 V N N N E F G W L I P K V M R I Y D T Q
 aggaaaatggacagagagcctcccaggctgctctgcagaaaaatgttaacgctgctgatg 1140
 K E M D R E A S Q A A L Q K M L T L L M
 ttgcctcctacatttggtagcctgctgaggaggaggtacattggggacaatggggatccc 1200
 L P P T F G D L L R E E Y I G D N G D P
 cagacctccaagcgagttccaggagatgatggcggaactccatgtttgtgatccctgca 1260
 Q T L Q A Q F Q E M M A D S M F V I P A
 ctccaagtagcacattttcagtggtcccgggccctgtgtacttctacgagttccagcat 1320
 L Q V A H F Q C S R A P V Y F Y E F Q H
 cagcccagctggctcaagaacatcacgccaccgcacatgaaggcagaccatggtgatgag 1380
 Q P S W L K N I R P P H M K A D H G D E
 ctcccttttggtttcagaagtcttcttggggcgaactacattaaattcactgaggaagag 1440
 L P F V F R S F F G G N Y I K F T E E E
 gagcagctaagcaggaagatgatgaagtactgggccaaactttgcgagaaaatgggaacccc 1500
 E Q L S R K M M K Y W A N F A R N G N P
 aatggcgaggggtctgccacactggccgctgttcgaccaggaggaggaacaatacctgcagctg 1560
 N G E G L P H W P L F D Q E E Q Y L Q L
 aacctacagcctgcggtggccgggctctgaaggccacaggctccagttctggaagaag 1620
 N L Q P A V G R A L K A H R L Q F W K K
 gcgctgccccaaaagatccaggagctcgaggagcctgaagagagacacacagagctgtag 1740
 A L P Q K I Q E L E E P E E R H T E L -

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10 / 10

FIG. 8B



THIS PAGE BLANK (USPTO)

LISTAGE DE SEQUENCES

<110> INSTITUT GUSTAVE ROUSSY

<120> COMPOSE PEPTIDIQUE DERIVE D'UNE ORF DECALEE DU GENE ice

<130> D18280

<160> 5

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 162

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Polypeptide codé par la phase ouverte de lecture
alternative et décalée (+1) de ice humain

<400> 1

Thr	Val	Val	Arg	Leu	Phe	Leu	Ala	Trp	Leu	Pro	Cys	Met	Met	Val	Pro
1				5					10					15	

Cys	Trp	Leu	Pro	Trp	Arg	Thr	Trp	Trp	Trp	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala
			20					25						30	

Trp	Val	Ser	Trp	Ala	Ser	Ser	Ala	Leu	Glu	Thr	Ser	Thr	Gln	Pro	Ala
		35					40					45			

Thr	Gly	Ala	Thr	Trp	Thr	Lys	Trp	Leu	His	Tyr	Ala	Gly	Ser	Ser	Arg
	50					55					60				

Ile	Ser	Pro	Thr	Leu	Glu	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Pro	Phe	Leu	Ala
65					70					75					80

Ser	Leu	Arg	Val	Ala	Arg	Val	Cys	Leu	Arg	Leu	Leu	Cys	Pro	Pro	Tyr
			85						90					95	

Pro	Lys	Asp	Ser	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Trp	Arg	Val	Ala	Trp	Pro	Ser
			100					105					110		

Cys	Pro	Ala	Ser	Leu	Pro	Ala	Gln	Leu	Met	Ser	Ser	Pro	Arg	Trp	Trp
		115					120					125			

Pro	Thr	Cys	Leu	Pro	Val	Thr	Lys	Leu	Thr	Leu	Arg	Pro	Trp	Trp	Ala
	130					135					140				

Ala	Cys	Gly	Ala	Arg	Val	Lys	Arg	Arg	Phe	Leu	Gln	Leu	Thr	Ser	Leu
145					150					155					160

Ser Arg

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2

<210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Fragment peptidique provenant de la SEQ ID n° 1
 entraînant une réponse T spécifique

<400> 2
 Ser Pro Arg Trp Trp Pro Thr Cys Leu
 1 5

<210> 3
 <211> 521
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Phase ouverte de lecture alternative et décalée
 (+1) de iCE

<400> 3
 acggtggtgc gcttggtttt ggcatggctt ccttgatatga tggttccatg ctggctgcct 60
 tggagaacgt ggtggtggtc atcatccagt accgcctggg tgcctgggc ttcttcagca 120
 ctggagacaa gcacgcaacc ggcaactggg gctacctgga ccaagtggct gcactacgct 180
 ggggccagca gaatatcgcc cactttggag gcaaccctga ccgtgtcacc atttttggcg 240
 agtctgcggg tggcacgagt gtgtcttcgc ttgttgtgtc ccccatatcc caaggactct 300
 tccacggagc catcatggag agtggcgtgg cctcctgcc cggcctcatt gccagctcag 360
 ctgatgtcat ctccacggtg gtggccaacc tgtctgcctg tgaccaagtt gactctgagg 420
 ccctggtggg ctgcctgcgg ggcaagagta aagaggagat tcttgcaatt aacaagcctt 480
 tcaagatgat ccccgagtg gtggatgggg tcttcctgcc c 521

<210> 4
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Amorce P1

<220>
 <223> Sens

<400> 4
 cccaagcttg gtgaatagca gcgtgtccgc 30

<210> 5
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Amorce P2

<220>
 <223> Antisens

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3

<400> 5

tgctctagaa gggagctaca gctctgtgtg

30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/01791

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K7/06 C12N9/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, SCISEARCH, CANCERLIT, EMBASE, CHEM
ABS Data, STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE GENEMBL 'Online! 28 April 1997 (1997-04-28) SCHWER ET AL.: "H.sapiens mRNA for putative carboxylesterase" XP002135540 cited in the application	9-13, 15, 16, 18-23
Y	Accession Y09616 -& SCHWER ET AL.: "Molecular cloning and characterization of a novel putative carboxylesterase, present in human intestine and liver" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 233, no. 1, 1997, pages 117-120, XP000891817 the whole document --- -/-	14-16, 20-23

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 December 2000

Date of mailing of the international search report

02/01/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

ALCONADA RODRIG..., A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. Application No

PCT/FR 00/01791

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE GENEMBL 'Online! 10 July 1996 (1996-07-10) PINDEL ET AL.: "Human carboxylesterase (hCE-2) mRNA, complete cds." XP002135541	9-13, 15, 16, 18-23
Y	Accession U60553 -& PINDEL ET AL.: "Purification and cloning of a broad substrate specificity human liver carboxylesterase that catalyzes the hydrolysis of cocaine and heroin" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 23, 6 June 1997 (1997-06-06), pages 14769-14775, XP002135538 the whole document	14-16, 20-23
X	DATABASE GENEMBL 'Online! 25 November 1997 (1997-11-25) SONE, T.: "Homo sapiens mRNA for carboxylesterase, complete cds." XP002135542	9-13, 15, 16, 18-23
Y	Accession D50579	14-16, 20-23
Y	WO 97 29183 A (US HEALTH ;HWU PATRICK (US); REEVES MARK (US); ROSENBERG STEVEN A) 14 August 1997 (1997-08-14) abstract	14-16, 20-23
A	HERR WOLFGANG ET AL: "The use of computer-assisted video image analysis for the quantification of CD8+ T lymphocytes producing tumor necrosis factor alpha spots in response to peptide antigens." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS 1997, vol. 203, no. 2, 1997, pages 141-152, XP002086405 ISSN: 0022-1759 cited in the application abstract	4, 6
A	WO 99 18206 A (WANG RONG FU ;GOVERNMENT OF THE UNITED STATE (US); ROSENBERG STEVE) 15 April 1999 (1999-04-15) page 12, line 26 -page 13, line 9 page 13, line 27 -page 15, line 7 page 18, line 6-11 claims 1-69	1-36
A	WO 98 55133 A (UNIV CALIFORNIA ;UNIV SOUTHERN CALIFORNIA (US)) 10 December 1998 (1998-12-10) the whole document	1-36

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/FR 00/01791

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MALARKANNAN SUBRAMANIAM ET AL: "A rare cryptic translation product is presented by K-b major histocompatibility complex class I molecule to alloreactive T cells." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE 1995, vol. 182, no. 6, 1995, pages 1739-1750, XP000864545 ISSN: 0022-1007</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>SHASTRI NILABH ET AL: "Major histocompatibility class I molecules can present cryptic translation Products to T-cells." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 1995, vol. 270, no. 3, 1995, pages 1088-1091, XP000891819 ISSN: 0021-9258</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
P,X	<p>RON SIN C ET AL: "A non-AUG-defined alternative open reading frame of the intestinal carboxyl esterase mRNA generates an epitope recognized by renal cell carcinoma-reactive tumor-infiltrating lymphocytes in situ." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 163, no. 1, 1 July 1999 (1999-07-01), pages 483-490, XP002135539 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01791

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0 9729183 A	14-08-1997	AU 2266097 A CA 2245170 A EP 0879281 A JP 2000505650 T	28-08-1997 14-08-1997 25-11-1998 16-05-2000
W0 9918206 A	15-04-1999	AU 9572098 A EP 1021535 A	27-04-1999 26-07-2000
W0 9855133 A	10-12-1998	AU 7724398 A	21-12-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema. internationale No

PCT/FR 00/01791

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C07K7/06 C12N9/18

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, SCISEARCH, CANCERLIT, EMBASE, CHEM
ABS Data, STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DATABASE GENEMBL 'en ligne! 28 avril 1997 (1997-04-28) SCHWER ET AL.: "H.sapiens mRNA for putative carboxylesterase" XP002135540 cité dans la demande	9-13, 15, 16, 18-23
Y	Accession Y09616 -& SCHWER ET AL.: "Molecular cloning and characterization of a novel putative carboxylesterase, present in human intestine and liver" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 233, no. 1, 1997, pages 117-120, XP000891817 le document en entier --- -/-	14-16, 20-23

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

A document définissant l'état général de la technique, non
considéré comme particulièrement pertinent

E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international
ou après cette date

L document pouvant jeter un doute sur une revendication de
priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une
autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à
une exposition ou tous autres moyens

P document publié avant la date de dépôt international, mais
postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la
date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la
technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe
ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut
être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité
inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée
ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive
lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres
documents de même nature, cette combinaison étant évidente
pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

13 décembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

02/01/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

ALCONADA RODRIG..., A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 00/01791

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DATABASE GENEMBL 'en ligne! 10 juillet 1996 (1996-07-10) PINDEL ET AL.: "Human carboxylesterase (hCE-2) mRNA, complete cds." XP002135541	9-13, 15, 16, 18-23
Y	Accession U60553 - & PINDEL ET AL.: "Purification and cloning of a broad substrate specificity human liver carboxylesterase that catalyzes the hydrolysis of cocaine and heroin" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 23, 6 juin 1997 (1997-06-06), pages 14769-14775, XP002135538 le document en entier	14-16, 20-23
X	DATABASE GENEMBL 'en ligne! 25 novembre 1997 (1997-11-25) SONE, T.: "Homo sapiens mRNA for carboxylesterase, complete cds." XP002135542	9-13, 15, 16, 18-23
Y	Accession D50579	14-16, 20-23
Y	WO 97 29183 A (US HEALTH ; HWU PATRICK (US); REEVES MARK (US); ROSENBERG STEVEN A) 14 août 1997 (1997-08-14) abrégé	14-16, 20-23
A	HERR WOLFGANG ET AL: "The use of computer-assisted video image analysis for the quantification of CD8+ T lymphocytes producing tumor necrosis factor alpha spots in response to peptide antigens." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS 1997, vol. 203, no. 2, 1997, pages 141-152, XP002086405 ISSN: 0022-1759 cité dans la demande abrégé	4, 6
A	WO 99 18206 A (WANG RONG FU ; GOVERNMENT OF THE UNITED STATE (US); ROSENBERG STEVE) 15 avril 1999 (1999-04-15) page 12, ligne 26 - page 13, ligne 9 page 13, ligne 27 - page 15, ligne 7 page 18, ligne 6-11 revendications 1-69	1-36
A	WO 98 55133 A (UNIV CALIFORNIA ; UNIV SOUTHERN CALIFORNIA (US)) 10 décembre 1998 (1998-12-10) le document en entier	1-36

	-/--	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema. internationale No

PCT/FR 00/01791

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>MALARKANNAN SUBRAMANIAM ET AL: "A rare cryptic translation product is presented by K-b major histocompatibility complex class I molecule to alloreactive T cells." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE 1995, vol. 182, no. 6, 1995, pages 1739-1750, XP000864545 ISSN: 0022-1007</p> <p>---</p>	
A	<p>SHASTRI NILABH ET AL: "Major histocompatibility class I molecules can present cryptic translation Products to T-cells." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 1995, vol. 270, no. 3, 1995, pages 1088-1091, XP000891819 ISSN: 0021-9258</p> <p>---</p>	
P,X	<p>RON SIN C ET AL: "A non-AUG-defined alternative open reading frame of the intestinal carboxyl esterase mRNA generates an epitope recognized by renal cell carcinoma-reactive tumor-infiltrating lymphocytes in situ." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 163, no. 1, 1 juillet 1999 (1999-07-01), pages 483-490, XP002135539 le document en entier</p> <p>-----</p>	1-36

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dema. internationale No

PCT/FR 00/01791

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9729183 A	14-08-1997	AU 2266097 A	28-08-1997
		CA 2245170 A	14-08-1997
		EP 0879281 A	25-11-1998
		JP 2000505650 T	16-05-2000
WO 9918206 A	15-04-1999	AU 9572098 A	27-04-1999
		EP 1021535 A	26-07-2000
WO 9855133 A	10-12-1998	AU 7724398 A	21-12-1998

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
4 janvier 2001 (04.01.2001)

PCT

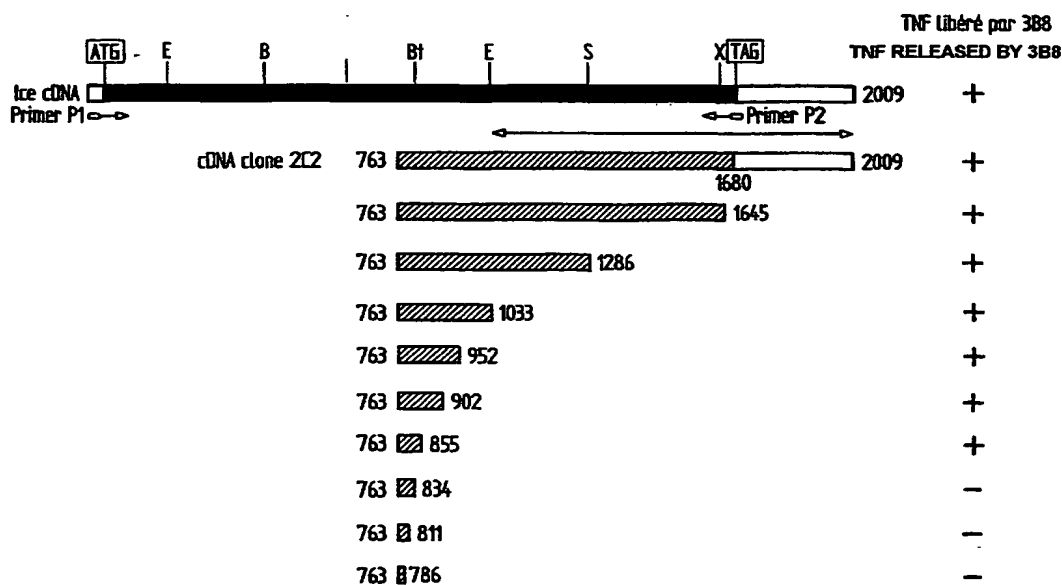
(10) Numéro de publication internationale
WO 01/00784 A3

- (51) Classification internationale des brevets⁷ : C07K 7/06, C12N 9/18
- (21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR00/01791
- (22) Date de dépôt international : 27 juin 2000 (27.06.2000)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité : 99/08224 28 juin 1999 (28.06.1999) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : INSTITUT GUSTAVE ROUSSY [FR/FR]; 39, rue Camille Desmoulins, F-98400 Villejuif (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : RONSIN, Christophe [FR/FR]; 3, rue de l'Abbé Pouchard, F-94160 Saint-Mande (FR). SCOTT, Véronique [FR/FR]; 32, rue Pierre Marie Derrien, F-94500 Champigny (FR). TRIEBEL, Frédéric [FR/FR]; 10, rue Saint-Louis, F-78000 Versailles (FR).
- (74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 20 rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).
- (81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: COMPOUND DERIVED FROM AN OFFSET ORF OF THE ICE GENE

(54) Titre : COMPOSE PEPTIDIQUE DERIVE D'UNE ORF DECALEE DU GENE ice



(57) Abstract: The invention concerns a peptide compound, causing a T specific response from tumours, comprising a sequence of at least 8 consecutive amino acids of the peptide sequence coded by a phase offset sequence of the iCE gene. The invention also concerns a pharmaceutical composition comprising said peptide compound and the use of said compounds for making a medicine for cancer treatment, in particular for treating solid tumours.

[Suite sur la page suivante]

WO 01/00784 A3



NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:

26 juillet 2001

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(57) Abrégé : La présente invention concerne un composé peptidique, entraînant une réponse T spécifique des tumeurs, qui comprend une séquence d'au moins 8 acides aminés consécutifs de la séquence peptidique codée par une séquence en phase décalée du gène iCE. L'invention porte également sur une composition pharmaceutique comportant ledit composé peptidique et sur l'utilisation de ces composés pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du cancer, en particulier au traitement des tumeurs solides.